

24734

**CERTIFICATION OF TRANSLATION**

Client: Heller, Ehrman, White & McAuliffe LLP
4250 Executive Square, 7th Floor
La Jolla, CA 92037-9103

Date: June 7, 2001

Document Name:


German Patent:

Patent Number: DE 3221681A

MASS SPECTROMETER WITH AN EXTERNAL SAMPLE HOLDER

Corporate Translations Inc., hereby certifies that to the best of our knowledge and belief, has made an accurate and complete translation from German to English of the original patent referenced above. The project has been adeptly managed through the three-phase quality process by three different experts: the translator, editor and proofreader. The translation team was specifically selected for their expertise in Science to insure an accurate translation.

All necessary information including qualifications and expertise for the translation teams is on file at Corporate Translations Inc.


Lori Anding
Production Manager

info@corporatetranslations.com

1300 Aviation Blvd. Redondo Beach, California 90278-4011 ☎ 310-376-1304 📠 310-376-139

19 **FEDERAL
REPUBLIC
OF GERMANY**

(Seal)

**GERMAN PATENT
OFFICE**

12 **Unpublished Patent**
11 **DE 32 21 681 A1**

21 Application number: P 32 21 681.5
22 Application date: 6/8/82
43 Date laid open to public
inspection: 12/8/83

51 Intl.
Classification³
H 01 J 49/04

71 Applicant:

Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE;
Leybold-Heraeus GmbH, 5000
Cologne, DE

72 Inventor(s):

Benninghoven, Alfred, Dr., 4400 Munster, DE;
Kämpf, Günther, Dr., 4150 Krefeld, DE; Holm,
Reimer, Dr., 5060 Bergisch-Gladbach, DE;
Heinen, Hans-Josef, Dr.; Meier, Stefan, 5000
Cologne, DE

75 Attorney(s):

None appointed at present

54 Mass spectrometer with an external sample holder

The investigated samples must be vaporized and ionized in the mass spectrometer to isolate the masses with the aid of electrical and/or magnetic fields. A laser pulse is used to vaporize and ionize the sample. The sample is not in the mass spectrometer as before, but rather affixed to a thin polymer film and placed on the outside of the mass spectrometer under normal pressure (air or inert gas). The polymer film is designed as the entrance window to the mass spectrometer chamber. A microscopic hole is created in the substrate film by the laser beam through which the sample at this location is vaporized into the mass spectrometer chamber. The diameter of the microscopic hole is so small that the high vacuum in the mass spectrometer is not impaired. The invention enables mass spectroscopic investigations of solid-state samples that decompose or evaporate in a vacuum. This opens up new fields for mass spectrometry.

Claims

1. Mass spectrometer (1) with a laser (2) to vaporizing and ionize the investigated sample, characterized in that the sample affixed to a thin polymer film (3) is on the outside of the mass spectrometer (1) under atmospheric pressure or inert gas, and the polymer film (3) is designed as an entrance window to the mass spectrometer area.
2. Mass spectrometer according to claim 1, characterized in that the polymer substrate film (3) is mechanically stabilized by a network or grid or by a single-hole or multi-hole diaphragm (16).
3. Mass spectrometer according to claims 1 and 2, characterized in that there are numerous samples (24) on the substrate film (3) in a matrix, and the substrate film (3) is adjustable relative to the laser beam by means of an X-Y table.
4. Mass spectrometer especially according to claim 3, characterized in that the hydrophobic substrate film (3) contains the surface pattern corresponding to the sample matrix by local water-proofing, and the samples (24) are deposited on the substrate film (3) by wetting the hydrophilic areas with a solution or suspension containing the samples.

5. Mass spectrometer according to claims 1-4, characterized in that the ions formed by the laser beam and released to the mass spectrometer chamber are captured by an attractive field and accelerated.
6. Mass spectrometer according to claims 1-5, characterized in that the mass spectrometer contains an additional ion source to reionize the vaporized sample.
7. Mass spectrometer according to claims 1-6, characterized in that the mass spectrometer is a flight time spectrometer.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 5090 Leverkusen, Bayerwerk

Central Area

Patents, trademarks and licenses Ki/bc/c [stamp: June 7, 1982]

Mass Spectrometer with an External Sample Holder

Mass spectrometers have become an essential tool for industry and research. By using non-destructive ionization methods, mass spectrometry is increasingly able to identify and demonstrate complicated organic compounds. New applications for pharmaceuticals, pesticides and biomedical research have resulted.

In all investigations of solids using mass spectrometry, the investigated sample on a suitable substrate must be placed in the mass spectrometer chamber. This usually takes a great deal of time since the mass spectrometer must be opened and then evacuated. By using devices with an airlock, the process can be automated and the preparation time substantially shortened. However, they have the disadvantage that they are elaborate and generally difficult to handle.

Frequently, solid samples contain both scarcely and highly volatile components. The latter may vaporize so quickly in the mass spectrometer chamber that the composition of the sample changes by the time it is analyzed. The mass spectrometric analysis is then incorrect (vacuum-sensitive substances).

Another disadvantage of conventional solid-state mass spectrometry is that traces of scarcely volatile components are deposited on different sites in the mass spectrometer chamber and can appear as a background in later measurements (memory effect). The highly volatile components are less problematic in this regard since they may be pumped out when simultaneously heating the apparatus.

Recently, mass spectrometers have been developed where the sample is vaporized and ionized in the mass spectrometer chamber by a laser flash. The formed ions are identified with a flight time spectrometer. Such mass spectrometers have a high transmission, a high spatial resolution, and are also suitable to demonstrate thermally sensitive organic components due to the non-destructive ionization. In particular, biological samples with a high spatial resolution (human or animal tissue) have been investigated for the first time (see for example R. Kaufmann et al., European Spectroscopy News, 20 (1978) p. 41-43).

In this field, post-mortem changes and drying artifacts substantially limit the possible applications.

To date, there have been no solutions to eliminate the above-described disadvantages and difficulties related to introducing samples into the mass spectrometer.

The invention seeks to deal with these problems. The goal is to use laser desorption to create a mass spectrometer that can better investigate vacuum-sensitive substances.

According to the invention, the above-described problems are solved in that the sample fixed to a thin polymer film is not introduced into the mass spectrometer chamber as before but is rather placed on the outside of the mass spectrometer under atmospheric pressure or inert gas, and the polymer film is designed as an entrance window to the mass spectrometer chamber. It was surprisingly found that the thin polymer substrate film (approx. 0.1 μm thick) can serve as a separating film between the atmosphere and the mass spectrometer (high vacuum), and the substrate film does not tear even when a laser is shot through it several times.

The polymer substrate film is usefully supported and mechanically stabilized by a network or grid or by a single-hole or multi-hole diaphragm.

In a development of the invention, there are numerous samples on the substrate film like a matrix, and the film is adjustable relative to the laser beam with an X-Y table. Such a sample matrix is usefully realized when a hydrophobic substrate film is given a surface pattern corresponding to the sample matrix by local water-proofing, and the samples are deposited on the substrate film by wetting the hydrophilic areas with a solution or suspension containing the samples.

The subclaims contain additional improvements and preferred embodiments of the mass spectrometer.

The invention has the following advantages:

- a) Solid bodies that consist of volatile and non-volatile components such as polymers with volatile additives are no longer exposed to the vacuum when analyzed with mass spectroscopy but are rather held under atmospheric pressure or inert gas and investigated. This largely prevents the samples from changing.

- b) It is possible to investigate water-containing thin sections or cell smears of biological samples without structural changes (artifacts) from drying and the vacuum.
- c) There is practically no contamination from scarcely volatile components and decomposition products (no memory effect).
- d) The preparation time (transfer time) between taking a sample and recording the mass spectrum can be substantially shortened since the samples do not have to be introduced into the mass spectrometer as before. It is substantially easier to handle and prepare the samples.
- e) The equipment to hold the samples outside of the mass spectrometer chamber is substantially simpler and permits a high degree of automation with comparatively little effort.

The invention allows mass spectrometry to be used in new areas such as polymer science, biology and medicine. The latter concerns in-vitro analysis as before, but it is much closer to in-vivo investigation. Beforehand, the high local resolution of conventional micro-mass analyzers using laser excitation was not exploited when analyzing such

samples since the components to be demonstrated dehydrated and subsequently migrated while the biological samples had to be prepared, so that the spatial allocation of the identified component was not possible. The new technique substantially improves the information of point analysis to identify the local position of a component in the biological sample (such as in a cell).

In the following, exemplary embodiments of the invention will be further explained with reference to drawings. Shown are:

Fig. 1 Schematic design of a micro-mass analyzer with laser excitation

Fig. 2 Conventional way of holding samples in the apparatus in Fig. 1

Fig. 3 Elevation of a new sample holder

Fig. 4 Top view of the new sample holder

Fig. 5 Elevation of preferred embodiment of the new sample holder for automated analysis of numerous samples, and

Fig. 6 Top view of the sample holder from Fig. 5.

The micro-mass analyzer with laser excitation schematically represented in Fig. 1 essentially consists of a flight time mass spectrometer 1 and a pulsed high-power laser 2 for vaporizing and ionizing the sample on a substrate 3. The laser beam is focused on the

sample by a semi-transparent deflection mirror 4 with the aid of an objective 5. By means of an eyepiece 6, the position of the sample in the mass spectrometer chamber can be controlled relative to the laser beam and adjusted if necessary.

The laser 2 generates a very short light pulse (laser flash) that abruptly vaporizes and largely ionizes the sample on the substrate 3. The formed ions are detected by the flight time spectrometer 1, separated by measuring the flight time, and they then sequentially contact the detector. A multiplier 7 is used as the detector that generates a sequence of electronic pulses corresponding to the contacting ionized components. The sequence of pulses is fed to a transient recorder 9 after amplification 8 and then recorded on a recording apparatus 10 and an oscillograph 11. The transient recorder 9 is triggered by the laser 2. The vacuum necessary to operate the flight time mass spectrometer 1 is generated with conventional vacuum pumps (connections 12). An electrical lens (ion lens) is usefully affixed to the entrance of the mass spectrometer 1. It generates an attractive field that captures and accelerates the ions generated by the laser flash.

In conventional apparatuses, a thin polymer film is used as the substrate for the sample that is placed in the high vacuum of the mass spectrometer (see Fig. 2). The high vacuum

is sealed with a glass pane 13 that is placed over a sealing ring 14 on the outer wall 15 of the mass spectrometer 1. The sample is on a polymer substrate film 3 that rests on a sample holder 16. The sample holder 16 is in a high vacuum and is installed over a central cutout 17 in the outer wall 15 of the mass spectrometer. The laser beam is focused through the glass pane 13 (entrance window) on the substrate film 3 with the sample on top.

It was found that the thin polymer substrate film (approx. $0.1\text{ }\mu\text{m}$ thick) can serve directly as a separating film between the atmosphere and the mass spectrometer (high vacuum), and the substrate film does not tear even after being penetrated several times with the laser. It was determined that the vacuum necessary to operate the mass spectrometer is not impaired even when there are several holes (approx. $2\text{ }\mu\text{m}$ in diameter). This fact allows the substrate film 3 with the sample to be placed on the outside of the mass spectrometer under atmospheric pressure or inter gas. The laser flash then vaporizes the sample on the film into the mass spectrometer chamber through a simultaneously arising hole in the film. A correspondingly modified sample holder is shown in an elevation in Fig. 3 and in a top view in Fig. 4.

The substrate film 3 with the sample lies on the sample holder 16 as in the embodiment in Fig. 2, but it is outside over the cutout 17 in the mass spectrometer 1. The seal against the mass spectrometer chamber is provided with a sealing ring 14 that is between the sample holder 16 and the outer wall 15 of the mass spectrometer. The substrate film 3 in this embodiment forms the entrance window to the mass spectrometer. Diaphragms can be used as the sample holder 16 that are conventionally used in electron spectroscopy. These are solid metal plates made e.g. of platinum, silver, steel approx. 1 mm thick that have one or more holes 18 that are 20-100 μm in diameter. The metal plate can have a large hole in the center that is covered with a metal net with a mesh width of 20-100 μm . The thin polymer film is drawn over the metal diaphragm, and it serves as a seal against the vacuum and as a substrate for the substance to be investigated. The metal diaphragm (single-hole or multi-hole diaphragm or network or grid) mechanically stabilizes the substrate film.

The substrate film 3 consists e.g. of collodion varnish, Zapon varnish or Formvar. These materials are also used in electron microscopy as substrate films. The substrate film 3 is applied to the sample holder 16 by lowering onto it a very thin film created by spreading

a collodion varnish, Zapon varnish or Formvar on the surface of water, e.g. in a separatory funnel or by creating the substrate film by spreading the varnish on a smooth substrate such as a glass plate. The film is released e.g. by slowly dipping it in water. Then the substrate film 3 is placed on the sample holder 16.

Electron microscope pictures demonstrate the surprisingly high vacuum resistance of the substrate films even after they are penetrated with several holes by the laser beam. The laser beam melts nearly perfectly circular holes 1-2 μm in diameter in the substrate film 0.1 μm thick. Systematic investigations show that the operability of the apparatus is retained even after several penetrations. The leaks that arise from the penetrations are so small that the vacuum is apparently not impaired in the apparatus. In addition, it is also possible to immediately seal the hole in the substrate film 3 that arises after being penetrated by the laser beam by daubing on a varnish (such as collodion varnish).

A preferred embodiment of the sample holder for automatically investigating numerous

samples is shown in Fig. 5 (cross-section) and Fig. 6 (top view). The sample holder 16 is a square plate with e.g. $5 \times 5 = 25$ individual holes 19 that are $50 \mu\text{m}$ in diameter. Congruent with this multiple-hole diaphragm are dots of numerous different samples applied to the substrate film 3 in a matrix. The sample holder 16 is a component of an X-Y table that can be moved along two coordinates (x and y). The X-Y table can be positioned as desired with the aid of stepping motors 20 and 21 in the x/y plane. On the sides opposite the motors, the X-Y table has resetting springs 22 and 23. The motors 20 and 21 are connected to a program control that allows the individual samples 24 to be sequentially placed in the optical axis, i.e., in line with the laser beam. The sample 24 centered at the contact point of the laser beam is vaporized by a laser flash, partially ionized, and it passes through the microscopic hole arising in the substrate film and the following hole 19 in the mass spectrometer chamber. The ion cloud is detected by an electrical lens and fed to the downstream flight time mass spectrometer where it is divided according to a mass/charge ratio, and the intensities of the molecule peaks are recorded. In principle, any mass spectrometer can be used that allows a simultaneous display of the mass spectrum. Flight time mass spectrometers meet this requirement and have especially proven themselves since they have a high transmission.

For instance in which ionizing the sample with the laser flash is insufficient; another ion source can be installed at the entrance 17 to the mass spectrometer chamber to reionize the vaporized sample.

The entire process for analyzing the $5 \times 5 = 25$ individual samples is completely automated with a program control coupled to stepping motors 20 and 21. In particular, the intensity of the molecule peaks for each analysis and can be assigned to individual samples in a downstream computer. Such a high degree of automation has not previously been attained with mass spectrometers of comparable design.

It is difficult to deposit the substance to be demonstrated on small, defined surfaces such as circular surfaces 10-50 μm in diameter on the substrate film 3. This problem can be solved by making the hydrophobic polymer substrate film locally hydrophilic by irradiating it with a correspondingly bundled electron or ion beam, or by treating it in a gas discharge operated with an alternating or direct current with intermediate corresponding diaphragms with suitably-sized circular cut-outs. In this manner, the substances to be demonstrated can be deposited in defined dots of a polar, especially aqueous solution or suspension to yield the above-described sample matrix.

This type of preparation can be generally used when the task is to crystallize the dissolved substance on a very small surface of the substrate or deposit it from the suspension by drying the liquid phase for mass spectroscopic analysis. By concentrating the sample to a very limited area, the area density of the component to be demonstrated and hence the sensitivity to detection can be increased on the substrate. This development can be used for other procedures in solid-state mass spectrometry such as secondary ion mass spectrometry.

There are also other conceivable applications where the mass spectrometer is only used to investigate numerous samples to see if certain components are present, or to systematically determine the concentration of a component. In such cases, the MS is set to the mass that is to be detected. In these investigations, the new sample holder can be combined with conventional MS such as quadrupole MS in connection with the laser. The laser only serves to transport the external sample into the MS chamber or the ion source. The sample is transported by being vaporized from the laser flash and by the inward flow into the vacuum from the hole burned in the substrate film.

-13-

Nummer:
Int. Cl.³:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

3221681
H01J 49/04
8. Juni 1982
8. Dezember 1983

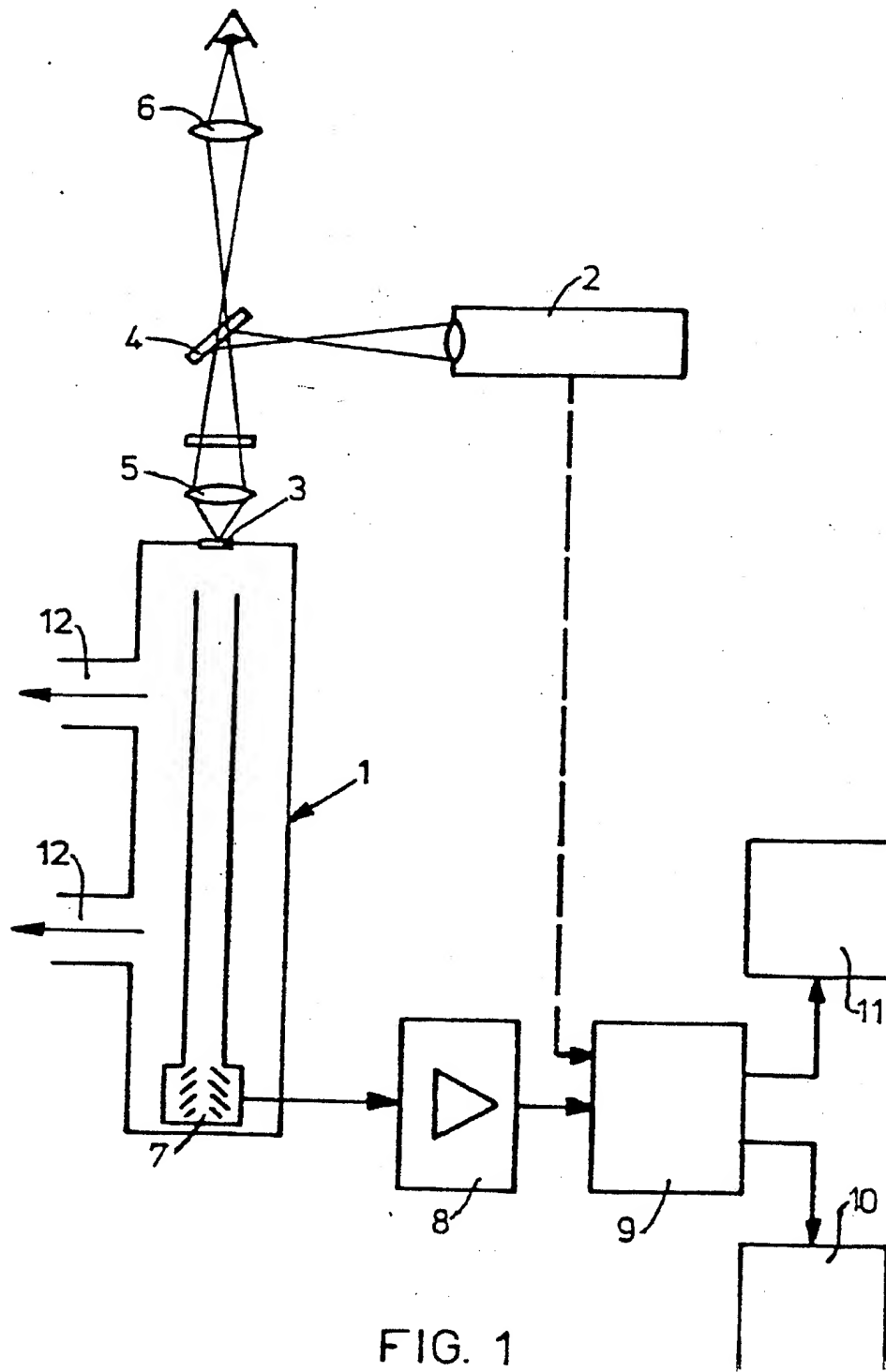


FIG. 1

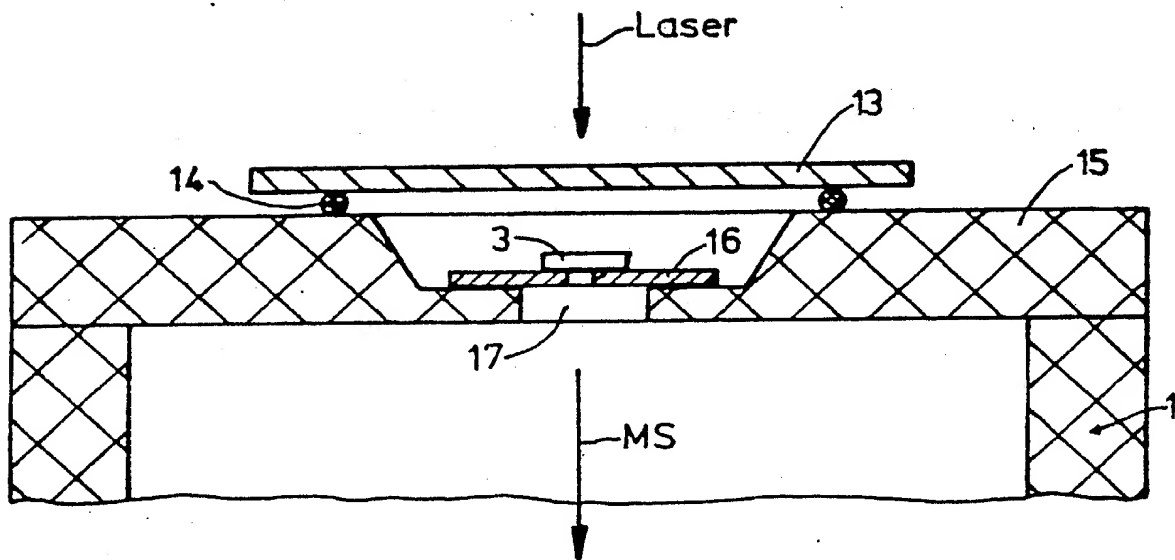


FIG. 2

2/2
8/1

-17-

3221681

3/4

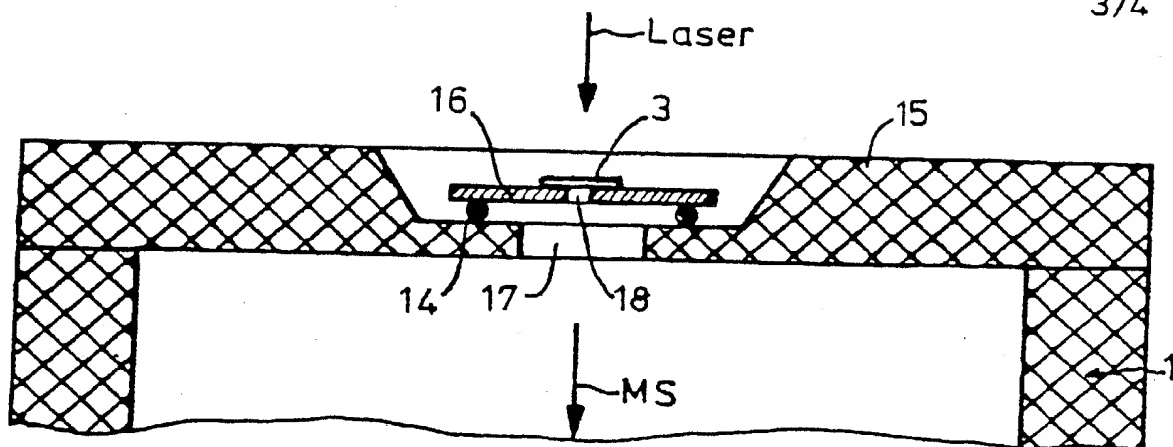


FIG. 3

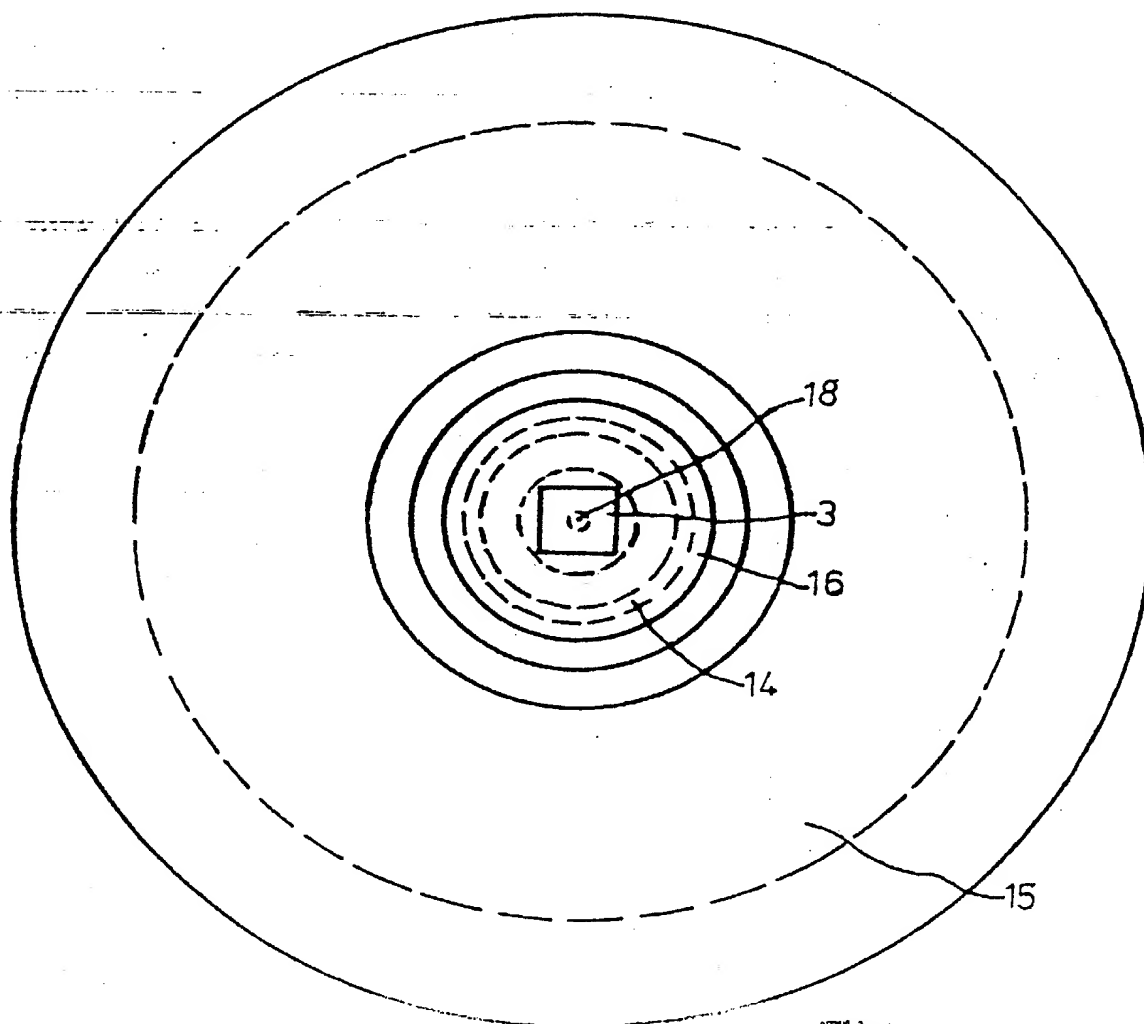


FIG. 4

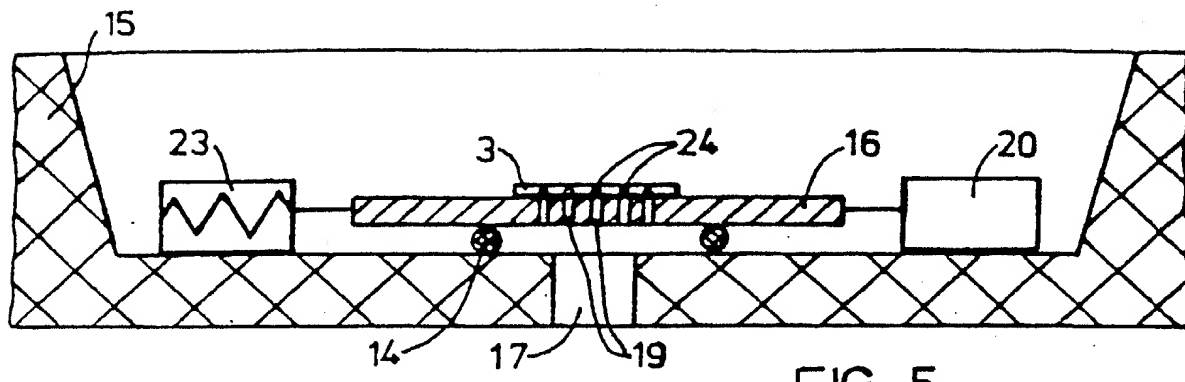


FIG. 5

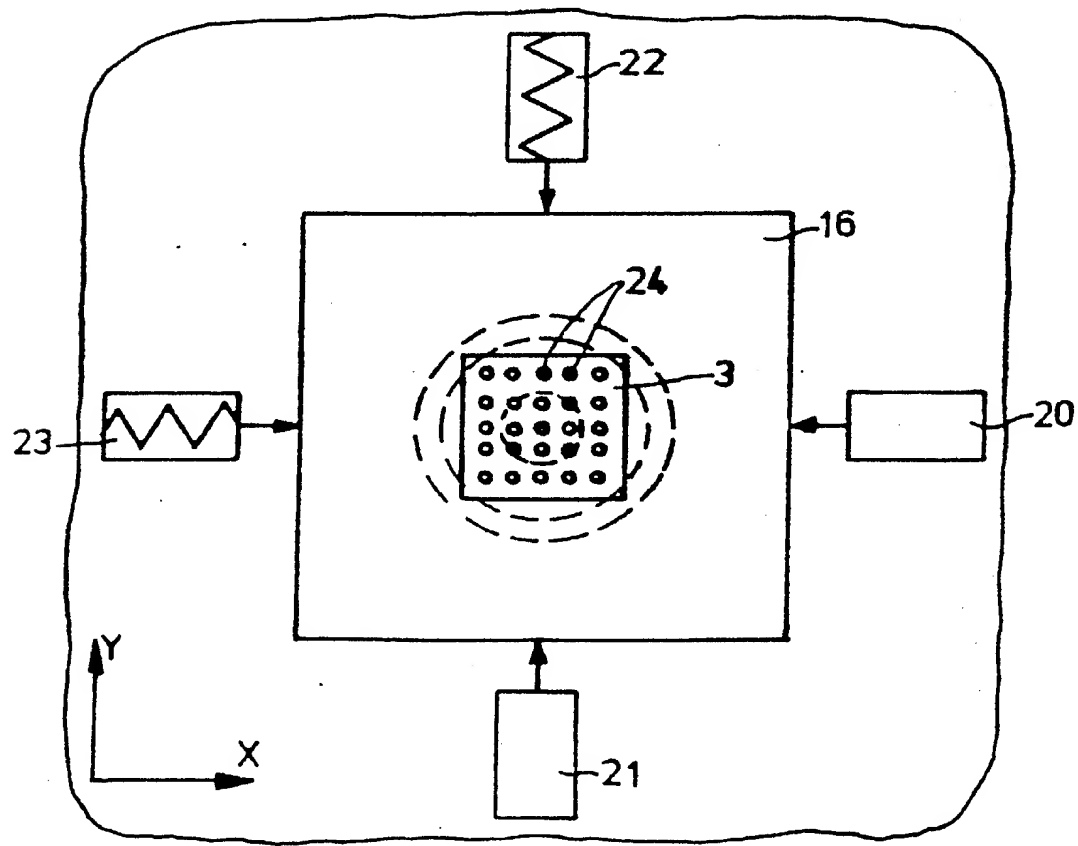


FIG. 6

(1) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(11) **DE 3221681 A1**

(51) Int. Cl. 3;
H01J 49/04

(21) Aktenzeichen: P 32 21 681.5
(22) Anmeldetag: 8. 6. 82
(43) Offenlegungstag: 8. 12. 83

DE 3221681 A1

(7) Anmelder:

Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE; Leybold-Heraeus GmbH, 5000 Köln, DE

(14) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:

Benninghoven, Alfred, Prof. Dr., 4400 Münster, DE;
Kämpf, Günther, Prof. Dr., 4150 Krefeld, DE; Holm, Reimer, Dr., 5060 Bergisch-Gladbach, DE; Heinen, Hans Josef, Dr.; Meier, Stefan, 5000 Köln, DE

(54) Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

Im Massenspektrometer muß die zu untersuchende Probe verdampft und ionisiert werden, um eine Massentrennung mit Hilfe von elektrischen und/oder magnetischen Feldern zu erreichen. Zur Verdampfung und Ionisierung der Probe wird ein Laser-Impuls benutzt. Die Probe befindet sich nicht mehr wie bisher im Massenspektrometer, sondern ist auf einer dünnen Polymerfolie fixiert und auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Normaldruck (Luft oder Schutzgas) angeordnet. Die Polymerfolie ist dabei als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet. Durch den Laserstrahl wird ein Mikroloch in die Trägerfolie gebrannt, durch das die an dieser Stelle befindliche Probe in den Massenspektrometerraum verdampft. Der Durchmesser des Mikroloches ist so klein, daß das Hochvakuum im Massenspektrometer nicht beeinträchtigt wird. Die Erfindung ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung von Festkörperproben, die sich im Vakuum zersetzen oder verflüchtigen würden. Dadurch können der Massenspektrometrie neue Anwendungsgebiete erschlossen werden.
(32 21 681)

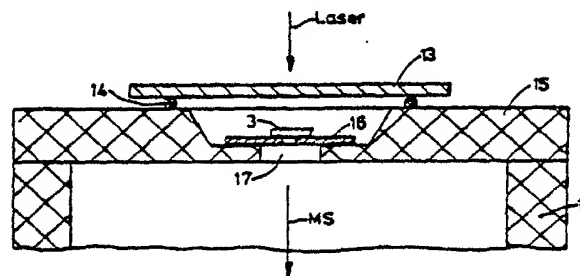


FIG. 2

Patentansprüche

- 5 ① Massenspektrometer (1) mit einem Laser (2) zur Verdampfung und Ionisierung der zu untersuchenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die auf einer dünnen Polymerfolie (3) fixierte Probe auf der Außenseite des Massenspektrometers (1) unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist und die Polymerfolie (3) als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist.
- 10 2) Massenspektrometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Trägerfolie (3) durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende (16) mechanisch stabilisiert ist.
- 15 3) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Trägerfolie (3) nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben (24) angeordnet ist und die Trägerfolie (3) mit Hilfe eines Kreutztisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist.
- 20 4) Massenspektrometer insbesondere nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die an sich hydrophobe Trägerfolie (3) durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben (24) durch Benetzung der
- 25 hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie (3) abgeschieden sind.

- 5) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die durch den Laserblitz gebildeten und in den Massenspektrometerraum gelangten Ionen durch ein Ziehfeld erfaßt und nachbeschleunigt werden.
- 5
- 6) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer eine zusätzliche Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe enthält.
- 10 7) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer ein Flugzeitspektrometer ist.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 5090 Leverkusen, Bayerwerk

Zentralbereich

Patente, Marken und Lizenzen Ki/bc/c

7. Juni 1982

Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

- Massenspektrometer sind heute zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel in Industrie und Forschung geworden. Durch Anwendung schonender Ionisierungsmethoden gelingt es auch in zunehmendem Maße, die Massenspektrometrie auf die Identifizierung und den Nachweis von komplizierten organischen Verbindungen auszudehnen. Dadurch ergeben sich neue Anwendungen auf dem Pharma- und Pflanzenschutzsektor sowie neuerdings auch in der biomedizinischen Forschung.
- Bei allen massenspektrometrischen Untersuchungen an Festkörpern muß bisher die zu untersuchende Probe auf einem geeigneten Objektträger in den evakuierten Massenspektrometerraum gebracht werden. Dies ist in der Regel mit erheblichem Zeitaufwand verbunden, da das Massenspektrometer geöffnet und anschließend wieder evakuiert werden muß. Bei Schleusenvorrichtungen kann zwar eine Automatisierung erreicht werden und die Vorbereitungszeit wesentlich verkürzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil, daß sie apparativ aufwendig und im allgemeinen schwierig zu handhaben sind.

Häufig enthalten Festkörperproben neben schwer flüchtigen auch leicht flüchtige Komponenten. Letztere verflüchtigen sich u.U. so schnell im Massenspektrometer-
raum, daß zum Zeitpunkt der Analyse die Zusammensetzung der Probe verändert ist. Die massenspektrometrische Analyse führt dann zu falschen Ergebnissen (vakuumempfindliche Substanzen).

Ein weiterer Nachteil der konventionellen Festkörpermassenspektrometrie liegt darin, daß sich Spuren von schwerflüchtigen Komponenten an anderen Stellen im Massenspektrometerraum niederschlagen und bei nachfolgenden Messungen als Untergrund in Erscheinung treten können (Memory Effekt). Die leicht flüchtigen Komponenten sind in dieser Hinsicht weniger problematisch, da sie gegebenenfalls bei gleichzeitigem Ausheizen der Apparatur abgepumpt werden.

In neuerer Zeit sind Massenspektrometer entwickelt worden, bei denen die Probe im Massenspektrometerraum durch einen Laserblitz verdampft und ionisiert wird. Die gebildeten Ionen werden mit Hilfe eines Flugzeitspektrometers identifiziert. Solche Massenspektrometer besitzen eine hohe Transmission, eine hohe räumliche Auflösung und sind wegen der schonenden Ionisierung auch zum Nachweis von thermisch labilen organischen Komponenten geeignet. Insbesondere konnten damit zum ersten Mal biologische Proben mit hohem räumlichen Auflösungsvermögen (menschliches oder tierisches Gewebe) untersucht werden (s. z.B. R. Kaufmann et al., European

- 8 -
5

Spectroscopy News 20 (1978), Seite 41-43). Gerade hier stellen bisher postmortale Veränderungen und Trocknungsartefakte eine wesentliche Einschränkung der Anwendungsmöglichkeiten dar.

- 5 Bisher gibt es noch keine Ansatzpunkte, wie man den oben beschriebenen, mit der Überführung ins Massenspektrometer verbundenen Nachteilen und Schwierigkeiten begegnen kann.

- 10 Hier setzt die Erfindung an. Es bestand die Zielsetzung, unter Ausnutzung der Laserdesorption ein Massenspektrometer zu schaffen, mit dem auch vakuumempfindliche Substanzen besser untersucht werden können.

- 15 Erfindungsgemäß können die oben beschriebenen Probleme dadurch gelöst werden, daß die auf einer dünnen Polymerfolie fixierte Probe nicht wie bisher in den Massenspektrometerraum eingebracht wird sondern auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist, wobei die Polymerfolie
- 20 als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die dünne polymere Trägerfolie (Dicke ca. 0,1µm) direkt als Trennfolie zwischen der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum) dienen kann und diese Träger-
- 25 folie auch bei mehrmaligem Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt.

Zweckmäßig ist die polymere Trägerfolie durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende abgestützt und mechanisch stabilisiert.

5 Eine Weiterentwicklung im Zusammenhang mit der Erfindung besteht darin, daß auf der Trägerfolie nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben angeordnet ist und die Folie mit Hilfe eines Kreuzzisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist. Vorteilhaft wird eine solche Probenmatrix dadurch realisiert, daß die an sich
10 hydrophobe Trägerfolie durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben durch Benetzung der hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie abge-
15 schieden sind.

Bezüglich weiterer Verbesserungen und bevorzugter Ausführungsformen des Massenspektrometers wird auf die Unteransprüche verwiesen.

Mit der Erfindung werden folgende Vorteile erzielt:

- 20 a) Festkörperproben, die sowohl aus flüchtigen als auch aus nicht flüchtigen Komponenten bestehen, z.B. Polymere mit flüchtigen Additiven werden bei der massenspektrometrischen Analyse nicht mehr dem Vakuum ausgesetzt sondern unter At-
25 mosphärendruck oder Schutzgas gehalten und untersucht. Dadurch können Veränderungen der Proben weitgehend ausgeschlossen werden.

- 5 -
7

- b) Es besteht die Möglichkeit, wasserhaltige Dünnschnitte oder Zellausstriche von biologischen Proben ohne strukturverändernde Belastung (Artefakte) durch Trocknung und Vakuum zu untersuchen.
- 5 c) Die Kontamination durch schwerflüchtige Komponenten und Zersetzungsprodukte ist praktisch ausgeschlossen (keine Memory Effekte).
- 10 d) Die zwischen der Entnahme einer Probe und der Aufnahme des Massenspektrums liegende Vorbereitungszeit (Überführungszeit) kann wesentlich verkürzt werden da die sonst notwendige Einschleusung der Proben ins Massenspektrometer entfällt. Die Handhabung und Vorbereitung der Proben ist wesentlich erleichtert.
- 15 e) Die Halterung der Proben außerhalb des Massenspektrometerraumes ist gerätetechnisch wesentlich einfacher und erlaubt mit verhältnismäßig geringem Aufwand einen hohen Automatisierungsgrad.

20 Mit der Erfindung werden daher der Massenspektrometrie neue Anwendungsgebiete z.B. im Polymerbereich und in Biologie und Medizin erschlossen. Bei letzteren handelt es sich zwar nach wie vor um eine in vitro-Analyse, die jedoch einer in vivo-Untersuchung bedeutend näher kommt. Bisher kam auch die hohe Ortsauflösung der

25 konventionellen Mikromassenanalysatoren mit Laseranregung bei solchen Proben nicht zum Tragen, weil bei der vorher notwendigen Präparation der biolo-

8

gischen Proben eine Entwässerung und damit verbunden eine Migration der nachzuweisenden Komponenten stattfindet, so daß eine räumliche Zuordnung der identifizierten Komponenten nicht mehr möglich war.
5 Durch die neue Technik wird die Aussagekraft der Punktanalyse zur Identifizierung der örtlichen Lage einer Komponente in der biologischen Probe (z.B. in einer Zelle) wesentlich verbessert.

10 Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Schematisch den Aufbau eines Mikromassenanalysators mit Laseranregung

15 Fig. 2 die konventionelle Art der Probenhalterung bei einer Apparatur gemäß Fig. 1

Fig. 3 die neue Probenhalterung in Aufrißdarstellung

Fig. 4 eine Draufsicht der neuen Probenhalterung

Fig. 5 eine bevorzugte Ausführung der neuen Probenhalterung zur automatischen Analyse einer Vielzahl von Proben in Aufrißdarstellung und
20

Fig. 6 die Probenhalterung gemäß Fig. 5 in Draufsicht.

Der in Fig. 1 schematisch dargestellte Mikromassenanalysator mit Laseranregung besteht im wesentlichen aus einem Flugzeitmassenspektrometer 1 und einem gepulsten Hochleistungslaser 2 zur Verdampfung und Ionisierung der auf einem Objektträger 3 befindlichen Probe. Der Laserstrahl wird über einen halbdurchlässi-
25

-14-

gen Umlenkspiegel 4 mit Hilfe eines Objektivs 5 auf die Probe fokussiert. Mit einem Okular 6 kann die Positionierung der Probe im Massenspektrometerraum relativ zum Laserstrahl visuell kontrolliert und bei Bedarf nachjustiert werden.

Der Laser 2 erzeugt einen sehr kurzen Lichtimpuls (Laserblitz), der die auf dem Objektträger 3 befindliche Probe schlagartig verdampft und zum größten Teil ionisiert. Die gebildeten Ionen werden von dem Flugzeitspektrometer 1 erfaßt, nach dem Prinzip der Laufzeitmessung separiert, und treffen dann nacheinander am Detektor ein. Als Detektor wird ein Multiplier 7 verwendet, der entsprechend den eintreffenden ionisierten Komponenten eine elektrische Impulsfolge erzeugt. Die Impulsfolge wird nach Verstärkung 8 einem Transientenrekorder 9 zugeführt und anschließend auf einem Schreiber 10 und einem Oszillographen 11 aufgezeichnet. Der Transientenrekorder 9 wird von dem Laser 2 getriggert. Das zum Betrieb des Flugzeitmassenspektrometers 1 erforderliche Vakuum wird mit handelsüblichen Vakuumpumpen erzeugt (Anschlüsse 12). Am Eingang des Massenspektrometers 1 ist zweckmäßig eine elektrische Linse (Ionenlinse) angebracht. Sie erzeugt ein Ziehfeld, mit dem die durch den Laserblitz erzeugten Ionen erfaßt und nachbeschleunigt werden.

Bei den konventionellen Apparaturen wird als Objektträger für die Probe eine dünne polymere Trägerfolie verwendet, die im Hochvakuum des Massenspektro-

5 meters angeordnet ist (s. Fig. 2). Die Abdichtung zum Hochvakuum erfolgt durch eine Glasscheibe 13 die über einen Dichtungsring 14 an der Außenwand 15 des Massenspektrometers 1 anliegt. Die Probe selbst ist auf einer polymeren Trägerfolie 3 angeordnet, die ihrerseits auf einer Probenhalterung 16 ruht. Die Probenhalterung 16 befindet sich im Hochvakuum und ist über einer zentralen Aussparung 17 in die Außenwand 15 des Massenspektrometers eingebaut. Der Laserstrahl wird durch die
10 Glasscheibe 13 (Eintrittsfenster) auf die Trägerfolie 3 mit der darauf befindlichen Probe fokussiert.

15 Es wurde nun gefunden, daß die dünne polymere Trägerfolie (Dicke ca. $0,1\mu\text{m}$) direkt als Trennfolie zwischen der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum) dienen kann und diese Trägerfolie auch bei mehrmaligem Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt. Dabei wurde festgestellt, daß das zum Betrieb des Massenspektrometers erforderliche Vakuum selbst durch mehrere solcher Löcher (Durchmesser ca. $2\mu\text{m}$) nicht beeinträchtigt wird. Diese Tatsache ermöglicht es, daß die
20 Trägerfolie 3 mit der Probe auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angebracht wird. Der Laserblitz sorgt dann dafür, daß die auf der Folie befindliche Probe durch ein gleichzeitig entstehendes Loch in der Folie in den Massenspektrometerraum verdampft. Eine entsprechend modifizierte Probenhalterung ist in Fig. 3 (Aufriß) und Fig. 4
25 (Draufsicht) dargestellt.

- 13 -
M

- Die Trägerfolie 3 mit der Probe liegt wie bei der Ausführung gemäß Fig. 2 auf der Probenhalterung 16, die jetzt atmosphärenseitig über der Aussparung 17 an dem Massenspektrometer 1 angeordnet ist. Die Abdichtung gegenüber dem Massenspektrometerraum erfolgt mittels des Dichtungsringes 14, der jetzt zwischen der Probenhalterung 16 und der Außenwand 15 des Massenspektrometers liegt. Die Trägerfolie 3 bildet bei dieser Ausführung das Eintrittsfenster zum Massenspektrometer hin. Als Probenhalter 16 können Blenden benutzt werden, wie sie z.B. in der Elektronenspektroskopie üblich sind. Dabei handelt es sich um massive Metallplatten, z.B. aus Platin, Silber, Stahl u.a. mit einer Dicke von ca. 1 mm, die eine oder mehrere Bohrungen 18 mit Durchmessern zwischen 20 und 100µm besitzen. Die Metallplatte kann auch zentrisch mit einer größeren Bohrung versehen sein, die ihrerseits mit einem Metallnetz mit Maschenweiten zwischen 20 und 100µm abgeschlossen ist. Auf diese Metallblenden wird die dünne Polymerfolie gespannt, die einerseits als Vakuumabschluß dient und andererseits als Objektträger für die zu untersuchende Substanz. Durch die Metallblende (Ein- oder Mehrlochblende bzw. Netz oder Gitter) wird die Trägerfolie mechanisch stabilisiert.
- Die Trägerfolie 3 besteht z.B. aus Kollodiumlack oder Zapponlack oder aus Formvar. Diese Materialien werden auch in der Elektronenmikroskopie als Trägerfolien benutzt. Die Aufbringung der Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 erfolgt durch Absenken einer durch Sprei-

ten von Kollodiumlack oder Zapponlack oder Formvar auf einer Wasseroberfläche erzeugten, sehr dünnen Folie, z.B. in einem Scheidetrichter oder durch Herstellung der Trägerfolie durch Spreiten des Lackes auf einem glatten Träger, z.B. auf einer Glasplatte. Das Ablösen der Folie geschieht z.B. durch langsames Eintauchen in Wasser. Anschließend wird die Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 überführt.

Der Beweis für die überraschend hohe Vakuumfestigkeit der Trägerfolien selbst nach Durchschuß mehrerer Löcher mit dem Laserstrahl konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erbracht werden. Dabei zeigte es sich, daß der Laserstrahl nahezu kreisrunde Löcher mit einem Durchmesser von 1 bis 2 μm in die 0,1 μm starke Trägerfolie schmilzt. Durch systematische Untersuchungen konnte sichergestellt werden, daß die Betriebsbereitschaft der Apparatur auch nach mehreren Durchschüssen erhalten bleibt. Die aufgrund der Durchschüsse entstehenden Lecks sind offensichtlich so klein, daß das Vakuum in der Apparatur nicht beeinträchtigt wird. Im übrigen besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß nach einem Durchschuß das in der Trägerfolie 3 entstandene Loch durch Betupfen mit einem Lack (z.B. Kollodiumlack) sofort wieder verschlossen wird.

Eine bevorzugte Ausführung der Probenhalterung zur automatischen Untersuchung einer Vielzahl von Proben ist in Fig. 5 (Querschnitt) und in Fig. 6 (Draufsicht) darge-

- 11 -
13

stellt. Die Probenhalterung 16 ist hier eine quadratische Platte mit z.B. $5 \times 5 = 25$ Einzellochbohrungen 19 mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$. Kongruent zu dieser Vielfachlochblende sind auf der Trägerfolie 3 nach Art einer Matrix eine Vielzahl von verschiedenen Proben punktuell aufgebracht. Die Probenhalterung 16 ist hier Bestandteil eines in 2 Koordinaten (x und y) verschiebbaren Kreuztisches. Der Kreuztisch kann mit Hilfe von Schrittmotoren 20 und 21 in der x/y-Ebene beliebig positioniert werden. Auf den den Motoren gegenüberliegenden Seiten ist der Kreuztisch mit Rückholfedern 22 und 23 versehen. Die Motoren 20 und 21 sind mit einer Programmsteuerung verbunden, die es gestattet, die Einzelproben 24 nacheinander in die optische Achse, d.h. an die Stelle des Laserstrahles, zu bringen. Die am Auftreffpunkt des Laserstrahles zentrierte Probe 24 wird dann durch einen Laserblitz verdampft, dabei z.T. ionisiert und gelangt durch das gleichzeitig in der Trägerfolie entstehende Mikroloch sowie durch die daran anschließende Bohrung 19 in den Massenspektrometerraum. Die Ionenwolke wird dort von einer elektrischen Linse erfaßt und dem nachgeschalteten Flugzeitmassenspektrometer zugeführt, wo eine Trennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis erfolgt und die Intensitäten der Molekülpeaks aufgezeichnet werden. Im Prinzip kann jedes Massenspektrometer verwendet werden, das eine Simultananzeige des Massenspektrums erlaubt. Flugzeitmassenspektrometer erfüllen diese Forderung und haben sich auch deswegen besonders bewährt, weil sie eine hohe Transmission besitzen.

Für den Fall, daß die Ionisierung der Probe durch den Laserblitz nicht ausreicht, kann am Eingang 17 des Massenspektrometerraumes eine weitere Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe eingebaut werden.

- 5 Der gesamte Analysenablauf für die Analyse der $5 \times 5 = 25$ Einzelproben erfolgt mit Hilfe der mit den Schrittmotoren 20 und 21 gekoppelten Programmsteuerung vollautomatisch. Insbesondere können die Intensitäten der zu jeder Einzelanalyse gehörenden Molekülpeaks in einem
10 nachgeschalteten Rechner den Einzelproben zugeordnet werden. Ein derartig hoher Automatisierungsgrad konnte bei Massenspektrometern vergleichbarer Bauart bisher nicht erreicht werden.

- 15 Schwierigkeiten bereitet es zunächst, die nachzuweisende Substanz auf kleinen vorbezeichneten Flächen, z.B. kreisförmige Flächen von 10 bis $50 \mu\text{m}$, auf der Trägerfolie 3 zu deponieren. Dieses Problem kann aber dadurch gelöst werden, daß die an sich hydrophobe polymere Trägerfolie durch Bestrahlung mit einem
20 entsprechend gebündelten Elektronen- oder Ionenstrahl, oder durch Behandlung in einer mit Gleich- oder Wechselstrom betriebenen Gasentladung unter Zwischenschaltung entsprechender Blenden mit kreisförmigen Ausschnitten geeignete Größe örtlich hydro-
25 philisiert wird. Auf diese Weise kann man die nachzuweisenden Substanzen aus einer polaren, insbesondere wäßrigen Lösung oder Suspension gezielt punktuell niederschlagen und erhält so die oben beschriebene Probenmatrix.

- 13 -
15

lack oder Formvar
ten, sehr dünnen Fo-
er oder durch Herstel-
ten des Lackes auf einem
asplatte. Das Ablösen
ngsames Eintauchen in
gerfolie 3 auf den

tion kann allgemein angewandt
abe besteht, zum Zwecke mas-
ntersuchungen die in Lösung
auf einer sehr kleinen Fläche
zukristallisieren oder aus
trocknung der flüssigen Phase
ch die Konzentrierung der Probe
en Fläche kann man die Flä-
weisenden Komponente auf dem
t die Nachweisempfindlichkeit
schritt kann auch für andere
permassenspektrometrie, wie
nmassenspektrometrie ausge-

ohne Vakuumfestigkeit
hschuß mehrerer Löcher
lfe elektronenmikros-
en. Dabei zeigte es
kreisrunde Löcher
µm in die 0,1µm
n systematische Un-
t werden, daß die
r auch nach mehreren
e aufgrund der Durch-
ffensichtlich so
atur nicht beein-
: natürlich auch die
schuß das in der Trä-
Betupfen mit einem
wieder verschlossen

benhalterung zur auto-
ahl von Proben ist in
(Draufsicht) darge-

gsfälle denkbar, wo das Mas-
azu benutzt wird, um eine Viel-
fhin zu untersuchen, ob eine
vorhanden ist oder nicht, oder
entrationsbestimmungen für eine
ren. In solchen Fällen wird
asse eingestellt, die detektiert
en Untersuchungen kann die neue
rbindung mit dem Laser auch mit
.B. Quadrupol-MS, kombiniert wer-
dann nur dazu, die außen angeord-
Raum bzw. in die Ionenquelle zu
transport beruht dabei einerseits
durch den Laserblitz und anderer-
omung ins Vakuum durch das einge-
trägerfolie.

-19-

Nummer:
Int. Cl. 3:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

3221681
H01J 49/04
8. Juni 1982
8. Dezember 1983

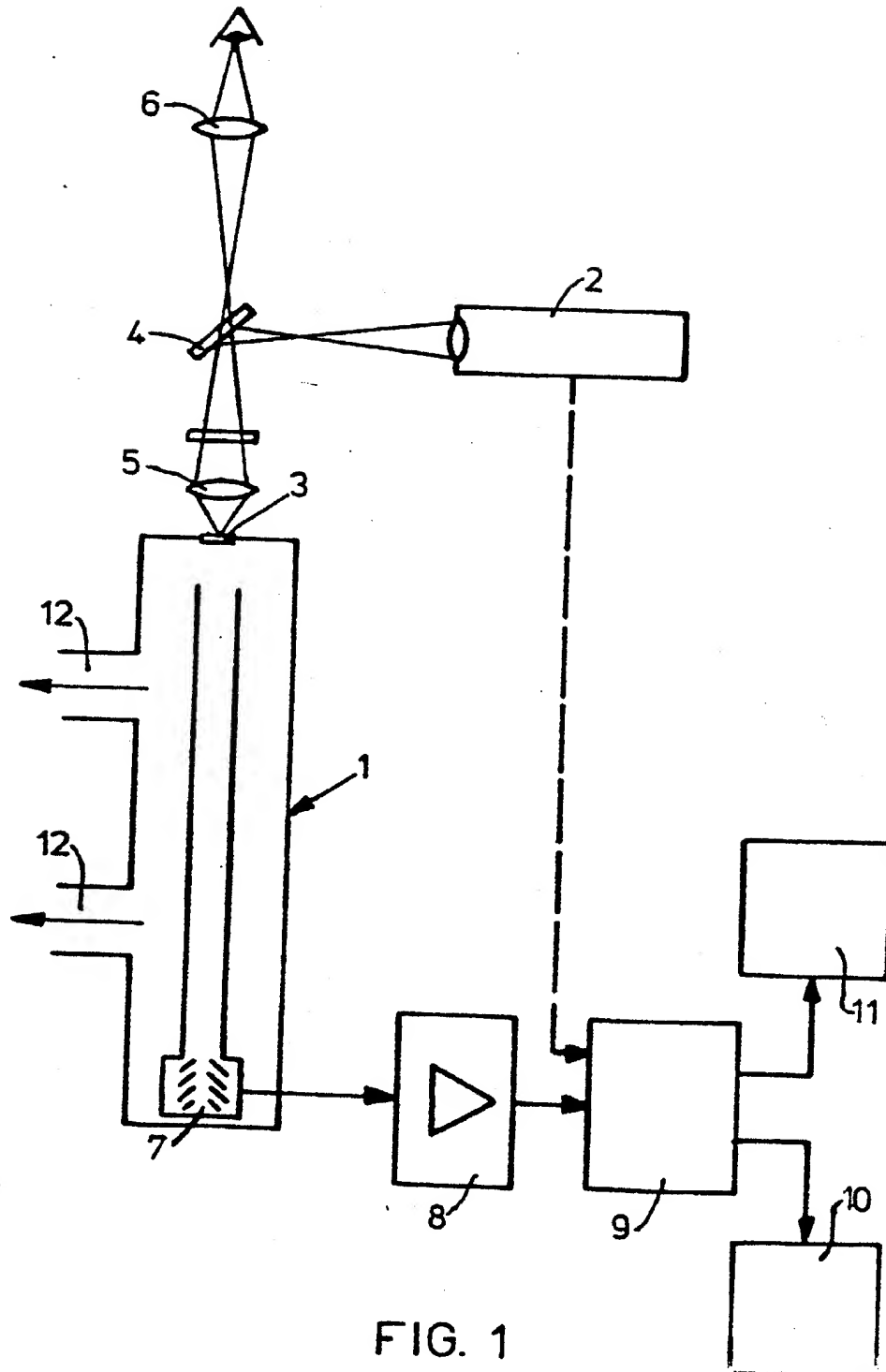


FIG. 1

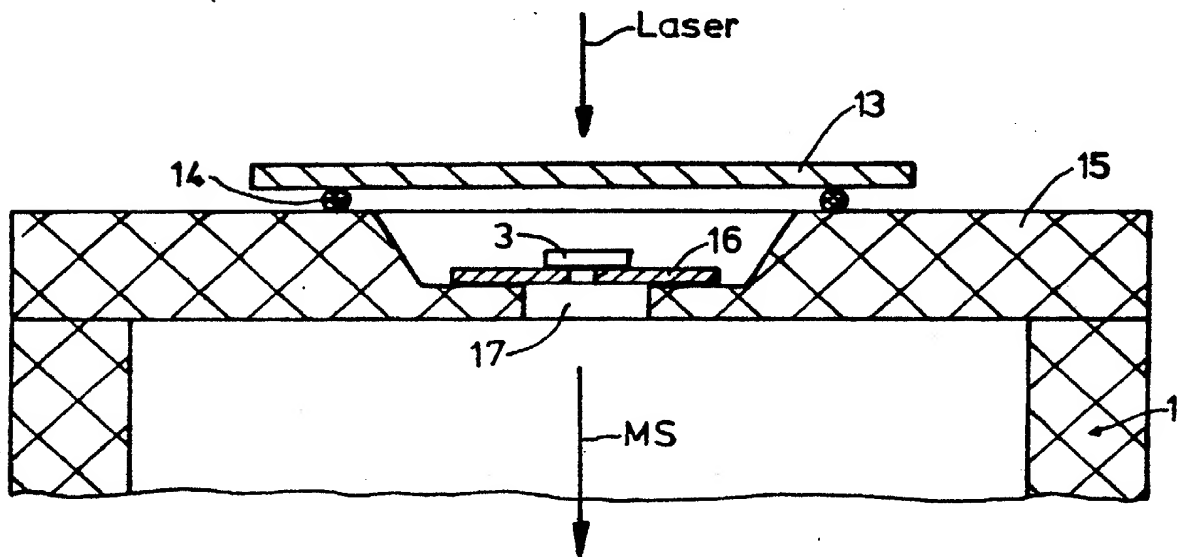


FIG. 2

-17-

3221681

3/4

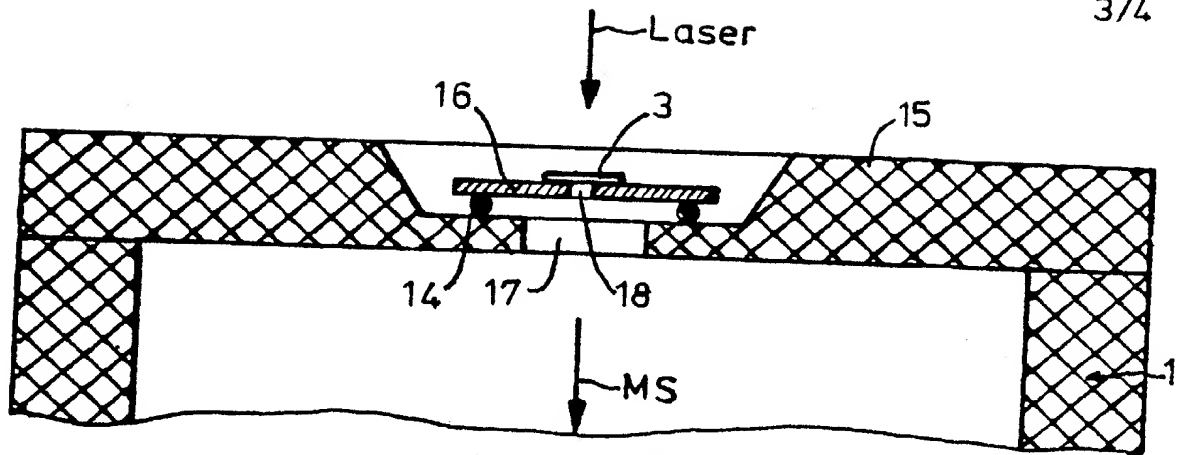


FIG. 3

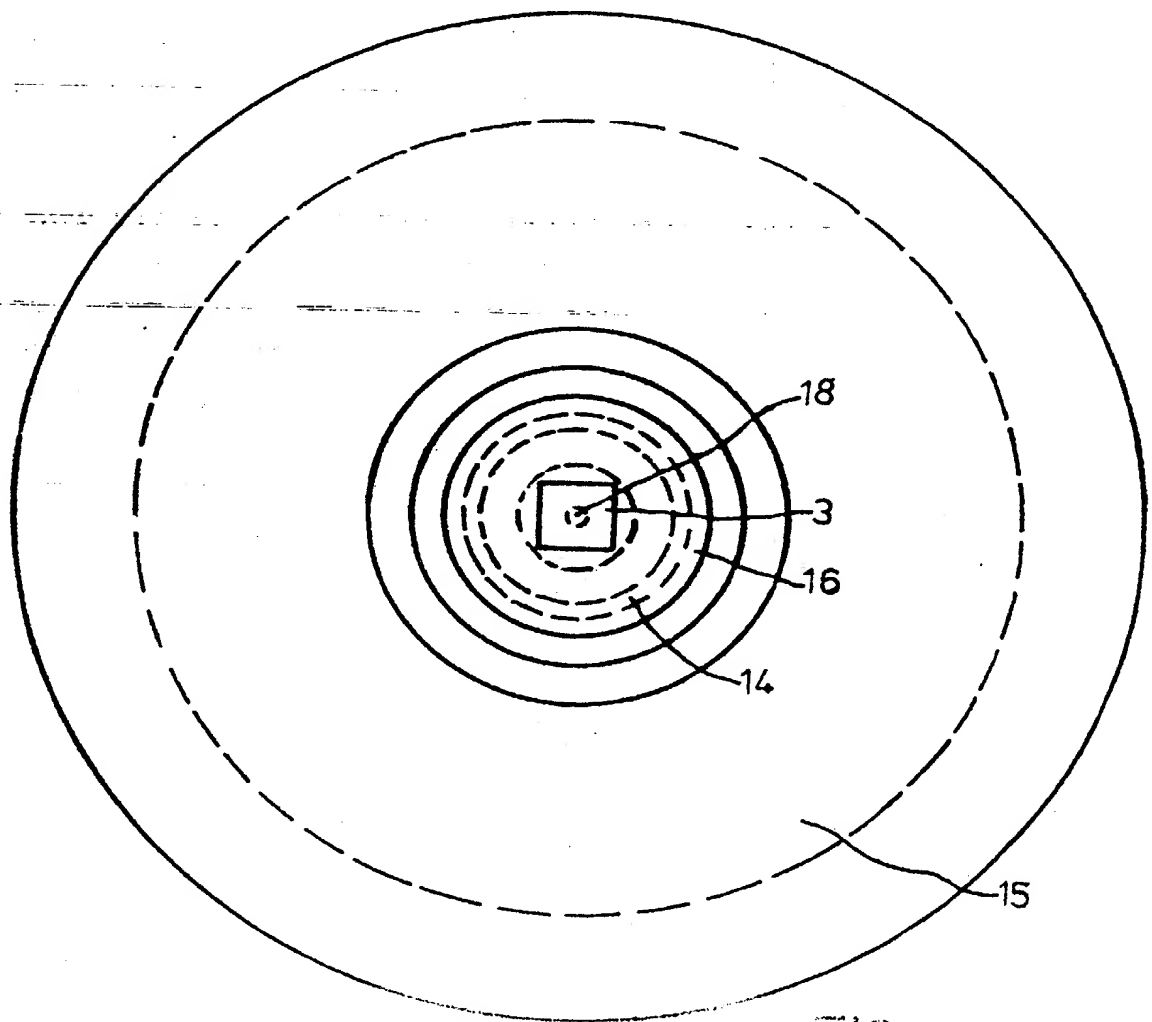


FIG. 4

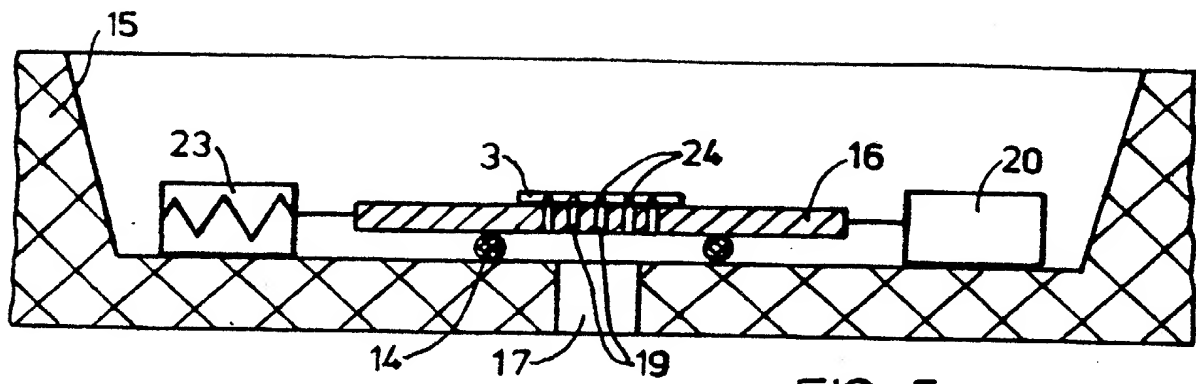


FIG. 5

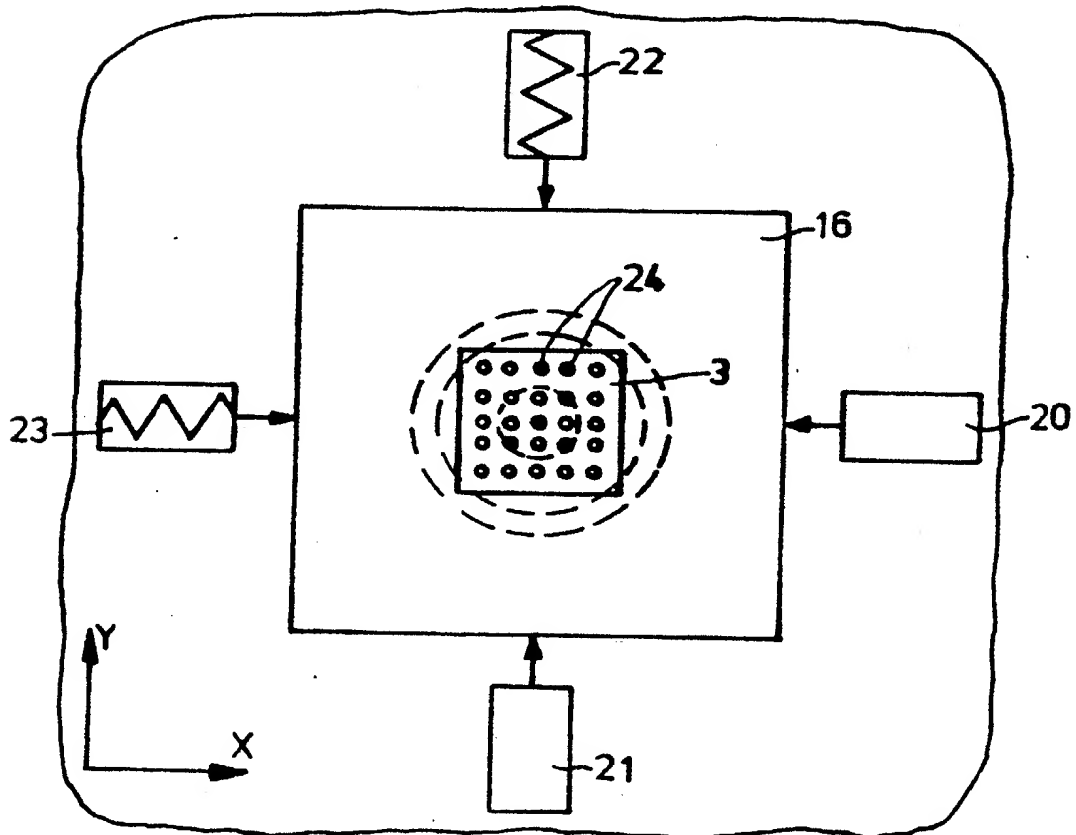


FIG. 6

(1) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(11) **DE 3221681 A1**

(51) Int. Cl. 3: ^{BH}
H01 J 49/04

(21) Aktenzeichen: P 32 21 681.5
(22) Anmeldetag: 8. 6. 82
(43) Offenlegungstag: 8. 12. 83

DE 3221681 A1

(7) Anmelder:

Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE; Leybold-Heraeus
GmbH, 5000 Köln, DE

(71) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:

Benninghoven, Alfred, Prof. Dr., 4400 Münster, DE;
Kämpf, Günther, Prof. Dr., 4150 Krefeld, DE; Holm,
Reimer, Dr., 5060 Bergisch-Gladbach, DE; Heinen,
Hans Josef, Dr.; Meier, Stefan, 5000 Köln, DE

(54) Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

Im Massenspektrometer muß die zu untersuchende Probe verdampft und ionisiert werden, um eine Massentrennung mit Hilfe von elektrischen und/oder magnetischen Feldern zu erreichen. Zur Verdampfung und Ionisierung der Probe wird ein Laser-Impuls benutzt. Die Probe befindet sich nicht mehr wie bisher im Massenspektrometer, sondern ist auf einer dünnen Polymerfolie fixiert und auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Normaldruck (Luft oder Schutzgas) angeordnet. Die Polymerfolie ist dabei als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet. Durch den Laserstrahl wird ein Mikroloch in die Trägerfolie gebrannt, durch das die an dieser Stelle befindliche Probe in den Massenspektrometerraum verdampft. Der Durchmesser des Mikroloches ist so klein, daß das Hochvakuum im Massenspektrometer nicht beeinträchtigt wird. Die Erfindung ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung von Festkörperproben, die sich im Vakuum zersetzen oder verflüchtigen würden. Dadurch können der Massenspektrometrie neue Anwendungsgebiete erschlossen werden.
(32 21 681)

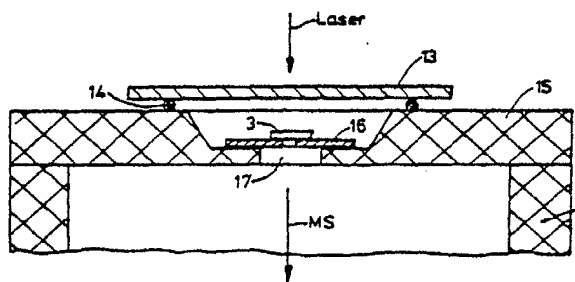


FIG. 2

Patentansprüche

- 5 ① Massenspektrometer (1) mit einem Laser (2) zur Verdampfung und Ionisierung der zu untersuchenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die auf einer dünnen Polymerfolie (3) fixierte Probe auf der Außenseite des Massenspektrometers (1) unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist und die Polymerfolie (3) als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist.
- 10 2) Massenspektrometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Trägerfolie (3) durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende (16) mechanisch stabilisiert ist.
- 15 3) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Trägerfolie (3) nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben (24) angeordnet ist und die Trägerfolie (3) mit Hilfe eines Kreuzzisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist.
- 20 4) Massenspektrometer insbesondere nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die an sich hydrophobe Trägerfolie (3) durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben (24) durch Benetzung der
- 25 hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie (3) abgeschieden sind.

Häufig enthalten Festkörperproben neben schwer flüchtigen auch leicht flüchtige Komponenten. Letztere verflüchtigen sich u.U. so schnell im Massenspektrometer-
raum, daß zum Zeitpunkt der Analyse die Zusammensetzung der Probe verändert ist. Die massenspektrometrische Analyse führt dann zu falschen Ergebnissen (vakuumempfindliche Substanzen).

Ein weiterer Nachteil der konventionellen Festkörpermassenspektrometrie liegt darin, daß sich Spuren von schwerflüchtigen Komponenten an anderen Stellen im Massenspektrometerraum niederschlagen und bei nachfolgenden Messungen als Untergrund in Erscheinung treten können (Memory Effekt). Die leicht flüchtigen Komponenten sind in dieser Hinsicht weniger problematisch, da sie gegebenenfalls bei gleichzeitigem Ausheizen der Apparatur abgepumpt werden.

In neuerer Zeit sind Massenspektrometer entwickelt worden, bei denen die Probe im Massenspektrometerraum durch einen Laserblitz verdampft und ionisiert wird. Die gebildeten Ionen werden mit Hilfe eines Flugzeitspektrometers identifiziert. Solche Massenspektrometer besitzen eine hohe Transmission, eine hohe räumliche Auflösung und sind wegen der schonenden Ionisierung auch zum Nachweis von thermisch labilen organischen Komponenten geeignet. Insbesondere konnten damit zum ersten Mal biologische Proben mit hohem räumlichen Auflösungsvermögen (menschliches oder tierisches Gewebe) untersucht werden (s. z.B. R. Kaufmann et al., European

- 8 -
5

Spectroscopy News 20 (1978), Seite 41-43). Gerade hier stellen bisher postmortale Veränderungen und Trocknungsartefakte eine wesentliche Einschränkung der Anwendungsmöglichkeiten dar.

- 5 Bisher gibt es noch keine Ansatzpunkte, wie man den oben beschriebenen, mit der Überführung ins Massenspektrometer verbundenen Nachteilen und Schwierigkeiten begegnen kann.

- 10 Hier setzt die Erfindung an. Es bestand die Zielsetzung, unter Ausnutzung der Laserdesorption ein Massenspektrometer zu schaffen, mit dem auch vakuumempfindliche Substanzen besser untersucht werden können.

- 15 Erfindungsgemäß können die oben beschriebenen Probleme dadurch gelöst werden, daß die auf einer dünnen Polymerfolie fixierte Probe nicht wie bisher in den Massenspektrometerraum eingebracht wird sondern auf der Außenseite des Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutzgas angeordnet ist, wobei die Polymerfolie
- 20 als Eintrittsfenster zum Massenspektrometerraum ausgebildet ist. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die dünne polymere Trägerfolie (Dicke ca. 0,1µm) direkt als Trennfolie zwischen der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum) dienen kann und diese Träger-
- 25 folie auch bei mehrmaligem Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt.

- 5) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die durch den Laserblitz gebildeten und in den Massenspektrometerraum gelangten Ionen durch ein Ziehfeld erfaßt und nachbeschleunigt werden.
- 5
- 6) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer eine zusätzliche Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe enthält.
- 10
- 7) Massenspektrometer nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Massenspektrometer ein Flugzeitspektrometer ist.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

5090 Leverkusen, Bayerwerk

Zentralbereich

Patente, Marken und Lizenzen Ki/bc/c

7. Juni 1982

Massenspektrometer mit externer Probenhalterung

- Massenspektrometer sind heute zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel in Industrie und Forschung geworden. Durch Anwendung schonender Ionisierungsmethoden gelingt es auch in zunehmendem Maße, die Massenspektrometrie auf die Identifizierung und den Nachweis von komplizierten organischen Verbindungen auszudehnen. Dadurch ergeben sich neue Anwendungen auf dem Pharma- und Pflanzenschutzsektor sowie neuerdings auch in der biomedizinischen Forschung.
- Bei allen massenspektrometrischen Untersuchungen an Festkörpern muß bisher die zu untersuchende Probe auf einem geeigneten Objektträger in den evakuierten Massenspektrometerraum gebracht werden. Dies ist in der Regel mit erheblichem Zeitaufwand verbunden, da das Massenspektrometer geöffnet und anschließend wieder evakuiert werden muß. Bei Schleusenvorrichtungen kann zwar eine Automatisierung erreicht werden und die Vorbereitungszeit wesentlich verkürzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil, daß sie apparativ aufwendig und im allgemeinen schwierig zu handhaben sind.

Zweckmäßig ist die polymere Trägerfolie durch ein Netz bzw. Gitter oder durch eine Ein- oder Mehrlochblende abgestützt und mechanisch stabilisiert.

5 Eine Weiterentwicklung im Zusammenhang mit der Erfindung besteht darin, daß auf der Trägerfolie nach Art einer Matrix eine Vielzahl von Proben angeordnet ist und die Folie mit Hilfe eines Kreuzzisches relativ zum Laserstrahl justierbar ist. Vorteilhaft wird eine solche Probenmatrix dadurch realisiert, daß die an sich
10 hydrophobe Trägerfolie durch örtliche Hydrophilierung ein der Probenmatrix entsprechendes Flächenmuster enthält und die Proben durch Benetzung der hydrophilierten Bereiche mit einer die jeweilige Probe enthaltenden Lösung oder Suspension auf der Trägerfolie abge-
15 schieden sind.

Bezüglich weiterer Verbesserungen und bevorzugter Ausführungsformen des Massenspektrometers wird auf die Unteransprüche verwiesen.

Mit der Erfindung werden folgende Vorteile erzielt:

- 20 a) Festkörperproben, die sowohl aus flüchtigen als auch aus nicht flüchtigen Komponenten bestehen, z.B. Polymere mit flüchtigen Additiven werden bei der massenspektrometrischen Analyse nicht mehr dem Vakuum ausgesetzt sondern unter At-
25 mosphärendruck oder Schutzgas gehalten und untersucht. Dadurch können Veränderungen der Proben weitgehend ausgeschlossen werden.

- 5/-
7

- b) Es besteht die Möglichkeit, wasserhaltige Dünnschnitte oder Zellausstriche von biologischen Proben ohne strukturverändernde Belastung (Artefakte) durch Trocknung und Vakuum zu untersuchen.
- 5 c) Die Kontamination durch schwerflüchtige Komponenten und Zersetzungsprodukte ist praktisch ausgeschlossen (keine Memory Effekte).
- 10 d) Die zwischen der Entnahme einer Probe und der Aufnahme des Massenspektrums liegende Vorbereitungszeit (Überführungszeit) kann wesentlich verkürzt werden da die sonst notwendige Einschleusung der Proben ins Massenspektrometer entfällt. Die Handhabung und Vorbereitung der Proben ist wesentlich erleichtert.
- 15 e) Die Halterung der Proben außerhalb des Massenspektrometerraumes ist gerätetechnisch wesentlich einfacher und erlaubt mit verhältnismäßig geringem Aufwand einen hohen Automatisierungsgrad.

20 Mit der Erfindung werden daher der Massenspektrometrie neue Anwendungsgebiete z.B. im Polymerbereich und in Biologie und Medizin erschlossen. Bei letzteren handelt es sich zwar nach wie vor um eine in vitro-Analyse, die jedoch einer in vivo-Untersuchung bedeutend näher kommt. Bisher kam auch die hohe Ortsauflösung der

25 konventionellen Mikromassenanalysatoren mit Laseranregung bei solchen Proben nicht zum Tragen, weil bei der vorher notwendigen Präparation der biolo-

gischen Proben eine Entwässerung und damit verbunden eine Migration der nachzuweisenden Komponenten stattfindet, so daß eine räumliche Zuordnung der identifizierten Komponenten nicht mehr möglich war.
5 Durch die neue Technik wird die Aussagekraft der Punktanalyse zur Identifizierung der örtlichen Lage einer Komponente in der biologischen Probe (z.B. in einer Zelle) wesentlich verbessert.

10 Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 Schematisch den Aufbau eines Mikromassenanalysators mit Laseranregung

15 Fig. 2 die konventionelle Art der Probenhalterung bei einer Apparatur gemäß Fig. 1

Fig. 3 die neue Probenhalterung in Aufrißdarstellung

Fig. 4 eine Draufsicht der neuen Probenhalterung

Fig. 5 eine bevorzugte Ausführung der neuen Probenhalterung zur automatischen Analyse einer Vielzahl von Proben in Aufrißdarstellung und
20

Fig. 6 die Probenhalterung gemäß Fig. 5 in Draufsicht.

Der in Fig. 1 schematisch dargestellte Mikromassenanalysator mit Laseranregung besteht im wesentlichen aus einem Flugzeitmassenspektrometer 1 und einem gepulsten Hochleistungslaser 2 zur Verdampfung und Ionisierung der auf einem Objektträger 3 befindlichen Probe. Der Laserstrahl wird über einen halbdurchlässi-

25

-14-

gen Umlenkspiegel 4 mit Hilfe eines Objektivs 5 auf die Probe fokussiert. Mit einem Okular 6 kann die Positionierung der Probe im Massenspektrometerraum relativ zum Laserstrahl visuell kontrolliert und bei Bedarf nachjustiert werden.

Der Laser 2 erzeugt einen sehr kurzen Lichtimpuls (Laserblitz), der die auf dem Objektträger 3 befindliche Probe schlagartig verdampft und zum größten Teil ionisiert. Die gebildeten Ionen werden von dem Flugzeitspektrometer 1 erfaßt, nach dem Prinzip der Laufzeitmessung separiert, und treffen dann nacheinander am Detektor ein. Als Detektor wird ein Multiplier 7 verwendet, der entsprechend den eintreffenden ionisierten Komponenten eine elektrische Impulsfolge erzeugt. Die Impulsfolge wird nach Verstärkung 8 einem Transientenrekorder 9 zugeführt und anschließend auf einem Schreiber 10 und einem Oszillographen 11 aufgezeichnet. Der Transientenrekorder 9 wird von dem Laser 2 getriggert. Das zum Betrieb des Flugzeitmassenspektrometers 1 erforderliche Vakuum wird mit handelsüblichen Vakuumpumpen erzeugt (Anschlüsse 12). Am Eingang des Massenspektrometers 1 ist zweckmäßig eine elektrische Linse (Ionenlinse) angebracht. Sie erzeugt ein Ziehfeld, mit dem die durch den Laserblitz erzeugten Ionen erfaßt und nachbeschleunigt werden.

Bei den konventionellen Apparaturen wird als Objektträger für die Probe eine dünne polymere Trägerfolie verwendet, die im Hochvakuum des Massenspektro-

meters angeordnet ist (s. Fig. 2). Die Abdichtung zum
 Hochvakuum erfolgt durch eine Glasscheibe 13 die über
 einen Dichtungsring 14 an der Außenwand 15 des Massen-
 spektrometers 1 anliegt. Die Probe selbst ist auf einer
 5 polymeren Trägerfolie 3 angeordnet, die ihrerseits auf
 einer Probenhalterung 16 ruht. Die Probenhalterung 16
 befindet sich im Hochvakuum und ist über einer zentra-
 len Aussparung 17 in die Außenwand 15 des Massenspek-
 trometers eingebaut. Der Laserstrahl wird durch die
 10 Glasscheibe 13 (Eintrittsfenster) auf die Trägerfolie 3
 mit der darauf befindlichen Probe fokussiert.

Es wurde nun gefunden, daß die dünne polymere Träger-
 folie (Dicke ca. 0,1µm) direkt als Trennfolie zwischen
 der Atmosphäre und dem Massenspektrometer (Hochvakuum)
 15 dienen kann und diese Trägerfolie auch bei mehrmaligem
 Durchschuß mit dem Laser nicht aufreißt. Dabei wurde
 festgestellt, daß das zum Betrieb des Massenspektro-
 meters erforderliche Vakuum selbst durch mehrere sol-
 cher Löcher (Durchmesser ca. 2µm) nicht beeinträch-
 20 tigt wird. Diese Tatsache ermöglicht es, daß die
 Trägerfolie 3 mit der Probe auf der Außenseite des
 Massenspektrometers unter Atmosphärendruck oder Schutz-
 gas angebracht wird. Der Laserblitz sorgt dann dafür,
 daß die auf der Folie befindliche Probe durch ein gleich-
 25 zeitig entstehendes Loch in der Folie in den Massenspek-
 trometerraum verdampft. Eine entsprechend modifizierte
 Probenhalterung ist in Fig. 3 (Aufriß) und Fig. 4
 (Draufsicht) dargestellt.

- 13 -
M

Die Trägerfolie 3 mit der Probe liegt wie bei der Ausführung gemäß Fig. 2 auf der Probenhalterung 16, die jetzt atmosphärenseitig über der Aussparung 17 an dem Massenspektrometer 1 angeordnet ist. Die Abdichtung gegenüber dem Massenspektrometerraum erfolgt mittels des Dichtungsringes 14, der jetzt zwischen der Probenhalterung 16 und der Außenwand 15 des Massenspektrometers liegt. Die Trägerfolie 3 bildet bei dieser Ausführung das Eintrittsfenster zum Massenspektrometer hin. Als Probenhalter 16 können Blenden benutzt werden, wie sie z.B. in der Elektronenspektroskopie üblich sind. Dabei handelt es sich um massive Metallplatten, z.B. aus Platin, Silber, Stahl u.a. mit einer Dicke von ca. 1 mm, die eine oder mehrere Bohrungen 18 mit Durchmessern zwischen 20 und 100µm besitzen. Die Metallplatte kann auch zentrisch mit einer größeren Bohrung versehen sein, die ihrerseits mit einem Metallnetz mit Maschenweiten zwischen 20 und 100µm abgeschlossen ist. Auf diese Metallblenden wird die dünne Polymerfolie gespannt, die einerseits als Vakuumabschluß dient und andererseits als Objektträger für die zu untersuchende Substanz. Durch die Metallblende (Ein- oder Mehrlochblende bzw. Netz oder Gitter) wird die Trägerfolie mechanisch stabilisiert.

Die Trägerfolie 3 besteht z.B. aus Kollodiumlack oder Zapponlack oder aus Formvar. Diese Materialien werden auch in der Elektronenmikroskopie als Trägerfolien benutzt. Die Aufbringung der Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 erfolgt durch Absenken einer durch Sprei-

ten von Kollodiumlack oder Zapponlack oder Formvar auf einer Wasseroberfläche erzeugten, sehr dünnen Folie, z.B. in einem Scheidetrichter oder durch Herstellung der Trägerfolie durch Spreiten des Lackes auf einem glatten Träger, z.B. auf einer Glasplatte. Das Ablösen der Folie geschieht z.B. durch langsames Eintauchen in Wasser. Anschließend wird die Trägerfolie 3 auf den Probenhalter 16 überführt.

Der Beweis für die überraschend hohe Vakuumfestigkeit der Trägerfolien selbst nach Durchschuß mehrerer Löcher mit dem Laserstrahl konnte mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erbracht werden. Dabei zeigte es sich, daß der Laserstrahl nahezu kreisrunde Löcher mit einem Durchmesser von 1 bis 2 μm in die 0,1 μm starke Trägerfolie schmilzt. Durch systematische Untersuchungen konnte sichergestellt werden, daß die Betriebsbereitschaft der Apparatur auch nach mehreren Durchschüssen erhalten bleibt. Die aufgrund der Durchschüsse entstehenden Lecks sind offensichtlich so klein, daß das Vakuum in der Apparatur nicht beeinträchtigt wird. Im übrigen besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß nach einem Durchschuß das in der Trägerfolie 3 entstandene Loch durch Betupfen mit einem Lack (z.B. Kollodiumlack) sofort wieder verschlossen wird.

Eine bevorzugte Ausführung der Probenhalterung zur automatischen Untersuchung einer Vielzahl von Proben ist in Fig. 5 (Querschnitt) und in Fig. 6 (Draufsicht) darge-

- 11 -
13

stellt. Die Probenhalterung 16 ist hier eine quadratische Platte mit z.B. $5 \times 5 = 25$ Einzellochbohrungen 19 mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$. Kongruent zu dieser Vielfachlochblende sind auf der Trägerfolie 3 nach Art einer Matrix eine Vielzahl von verschiedenen Proben punktuell aufgebracht. Die Probenhalterung 16 ist hier Bestandteil eines in 2 Koordinaten (x und y) verschiebbaren Kreutztisches. Der Kreutztisch kann mit Hilfe von Schrittmotoren 20 und 21 in der x/y-Ebene beliebig positioniert werden. Auf den den Motoren gegenüberliegenden Seiten ist der Kreutztisch mit Rückholfedern 22 und 23 versehen. Die Motoren 20 und 21 sind mit einer Programmsteuerung verbunden, die es gestattet, die Einzelproben 24 nacheinander in die optische Achse, d.h. an die Stelle des Laserstrahles, zu bringen. Die am Auftreffpunkt des Laserstrahles zentrierte Probe 24 wird dann durch einen Laserblitz verdampft, dabei z.T. ionisiert und gelangt durch das gleichzeitig in der Trägerfolie entstehende Mikroloch sowie durch die daran anschließende Bohrung 19 in den Massenspektrometerraum. Die Ionenwolke wird dort von einer elektrischen Linse erfaßt und dem nachgeschalteten Flugzeitmassenspektrometer zugeführt, wo eine Trennung nach dem Masse/Ladungsverhältnis erfolgt und die Intensitäten der Molekülpeaks aufgezeichnet werden. Im Prinzip kann jedes Massenspektrometer verwendet werden, das eine Simultananzeige des Massenspektrums erlaubt. Flugzeitmassenspektrometer erfüllen diese Forderung und haben sich auch deswegen besonders bewährt, weil sie eine hohe Transmission besitzen.

Für den Fall, daß die Ionisierung der Probe durch den Laserblitz nicht ausreicht, kann am Eingang 17 des Massenspektrometerraumes eine weitere Ionenquelle zur Nachionisierung der verdampften Probe eingebaut werden.

- 5 Der gesamte Analysenablauf für die Analyse der $5 \times 5 = 25$ Einzelproben erfolgt mit Hilfe der mit den Schrittmotoren 20 und 21 gekoppelten Programmsteuerung vollautomatisch. Insbesondere können die Intensitäten der zu jeder Einzelanalyse gehörenden Molekülpeaks in einem
10 nachgeschalteten Rechner den Einzelproben zugeordnet werden. Ein derartig hoher Automatisierungsgrad konnte bei Massenspektrometern vergleichbarer Bauart bisher nicht erreicht werden.

- 15 Schwierigkeiten bereitet es zunächst, die nachzuweisende Substanz auf kleinen vorbezeichneten Flächen, z.B. kreisförmige Flächen von 10 bis 50 μm , auf der Trägerfolie 3 zu deponieren. Dieses Problem kann aber dadurch gelöst werden, daß die an sich hydrophobe polymere Trägerfolie durch Bestrahlung mit einem
20 entsprechend gebündelten Elektronen- oder Ionenstrahl, oder durch Behandlung in einer mit Gleich- oder Wechselstrom betriebenen Gasentladung unter Zwischenschaltung entsprechender Blenden mit kreisförmigen Ausschnitten geeignete Größe örtlich hydro-
25 philisiert wird. Auf diese Weise kann man die nachzuweisenden Substanzen aus einer polaren, insbesondere wäßrigen Lösung oder Suspension gezielt punktuell niederschlagen und erhält so die oben beschriebene Probenmatrix.

- Diese Art der Präparation kann allgemein angewandt werden, wenn die Aufgabe besteht, zum Zwecke massenspektrometrischer Untersuchungen die in Lösung befindliche Substanz auf einer sehr kleinen Fläche des Objektträgers auszukristallisieren oder aus
5 der Suspension durch Trocknung der flüssigen Phase niederzuschlagen. Durch die Konzentrierung der Probe auf einer eng begrenzten Fläche kann man die Flächendichte der nachzuweisenden Komponente auf dem
10 Objektträger und damit die Nachweisempfindlichkeit erhöhen. Dieser Fortschritt kann auch für andere Verfahren der Festkörpermassenspektrometrie, wie z.B. die Sekundärionenmassenspektrometrie ausgenutzt werden.
- 15 Es sind auch Anwendungsfälle denkbar, wo das Massenspektrometer nur dazu benutzt wird, um eine Vielzahl von Proben daraufhin zu untersuchen, ob eine bestimmte Komponente vorhanden ist oder nicht, oder um systematische Konzentrationsbestimmungen für eine
20 Komponente durchzuführen. In solchen Fällen wird das MS fest auf die Masse eingestellt, die detektiert werden soll. Bei diesen Untersuchungen kann die neue Probenhalterung in Verbindung mit dem Laser auch mit konventionellen MS, z.B. Quadrupol-MS, kombiniert werden.
25 Der Laser dient dann nur dazu, die außen angeordnete Probe in den MS-Raum bzw. in die Ionenquelle zu transportieren. Der Transport beruht dabei einerseits auf der Verdampfung durch den Laserblitz und andererseits auf der Einströmung ins Vakuum durch das eingebrannte Loch in der Trägerfolie.
30

-19-

Nummer:
Int. Cl.³:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

3221681
H01J 49/04
8. Juni 1982
8. Dezember 1983

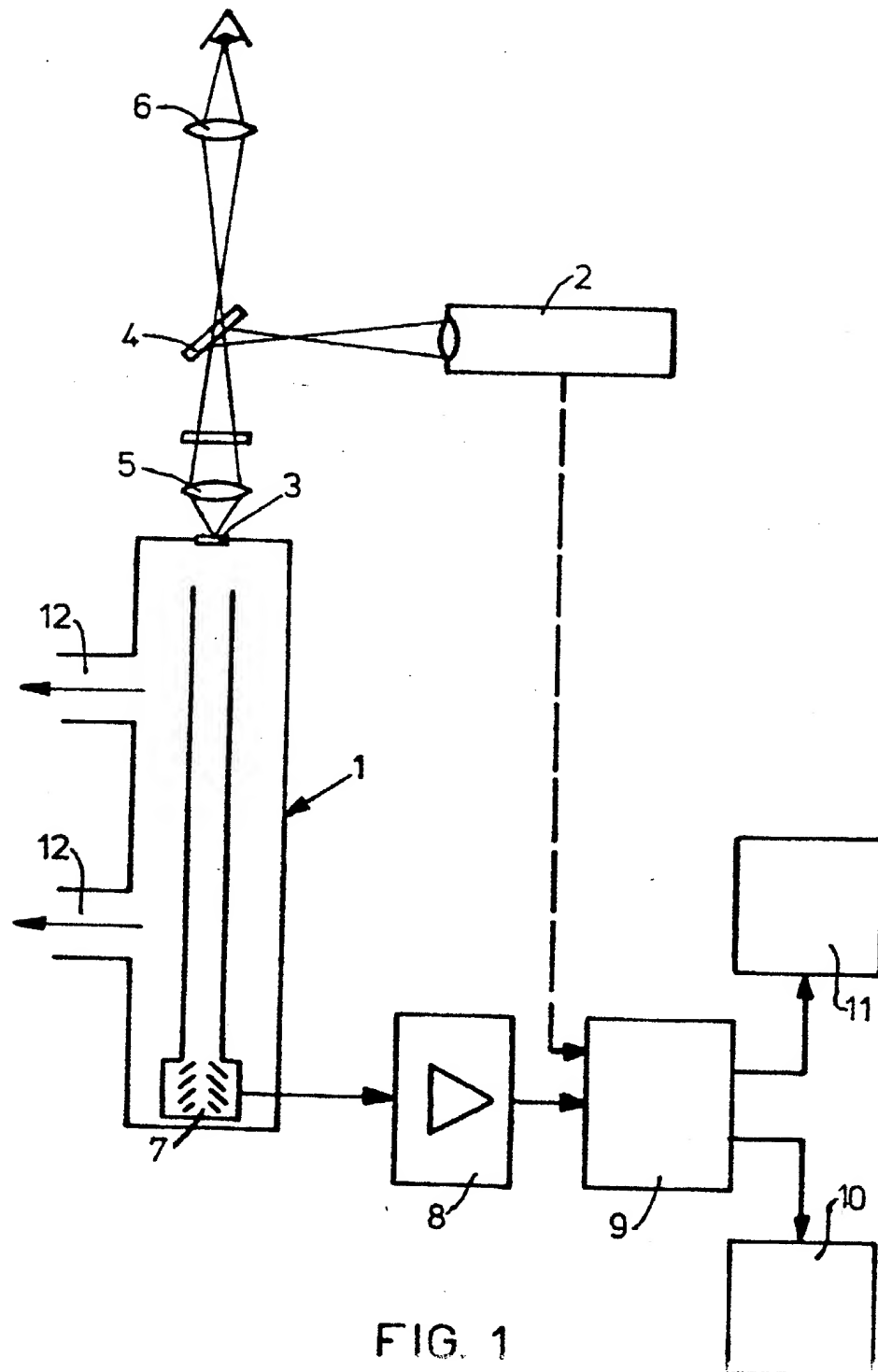


FIG. 1

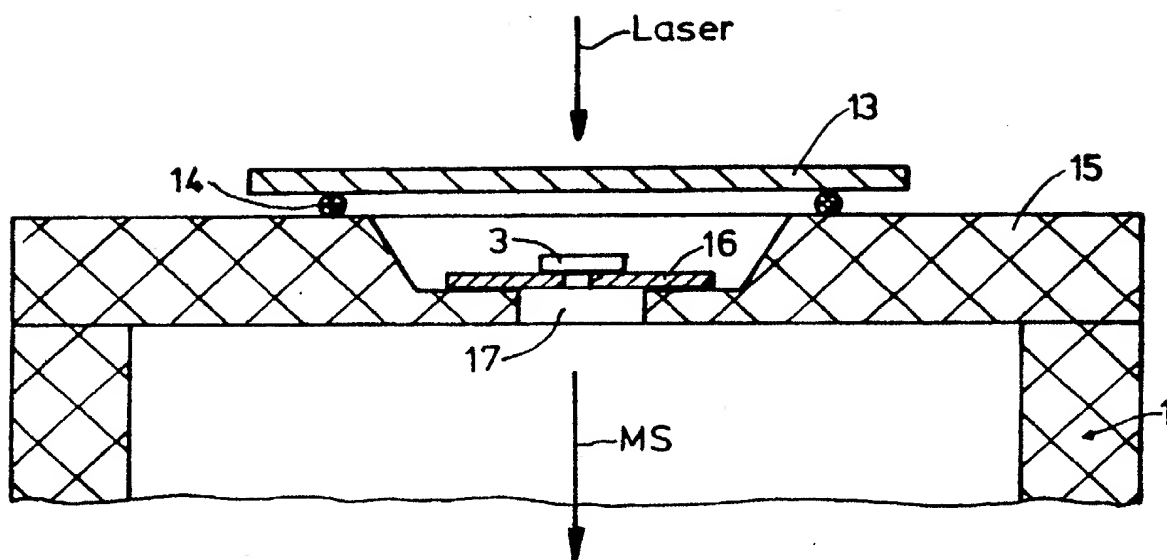


FIG. 2

-17-

3221681

3/4

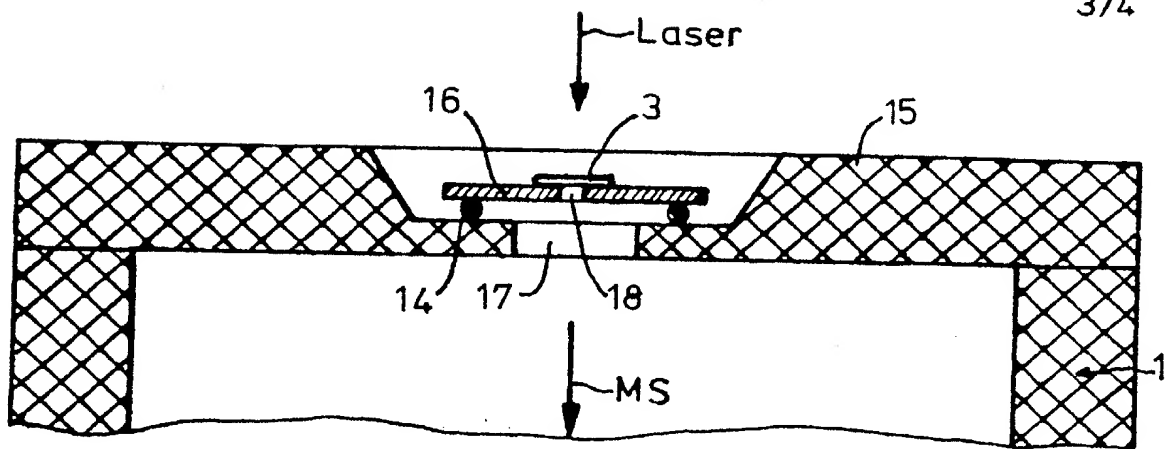


FIG. 3

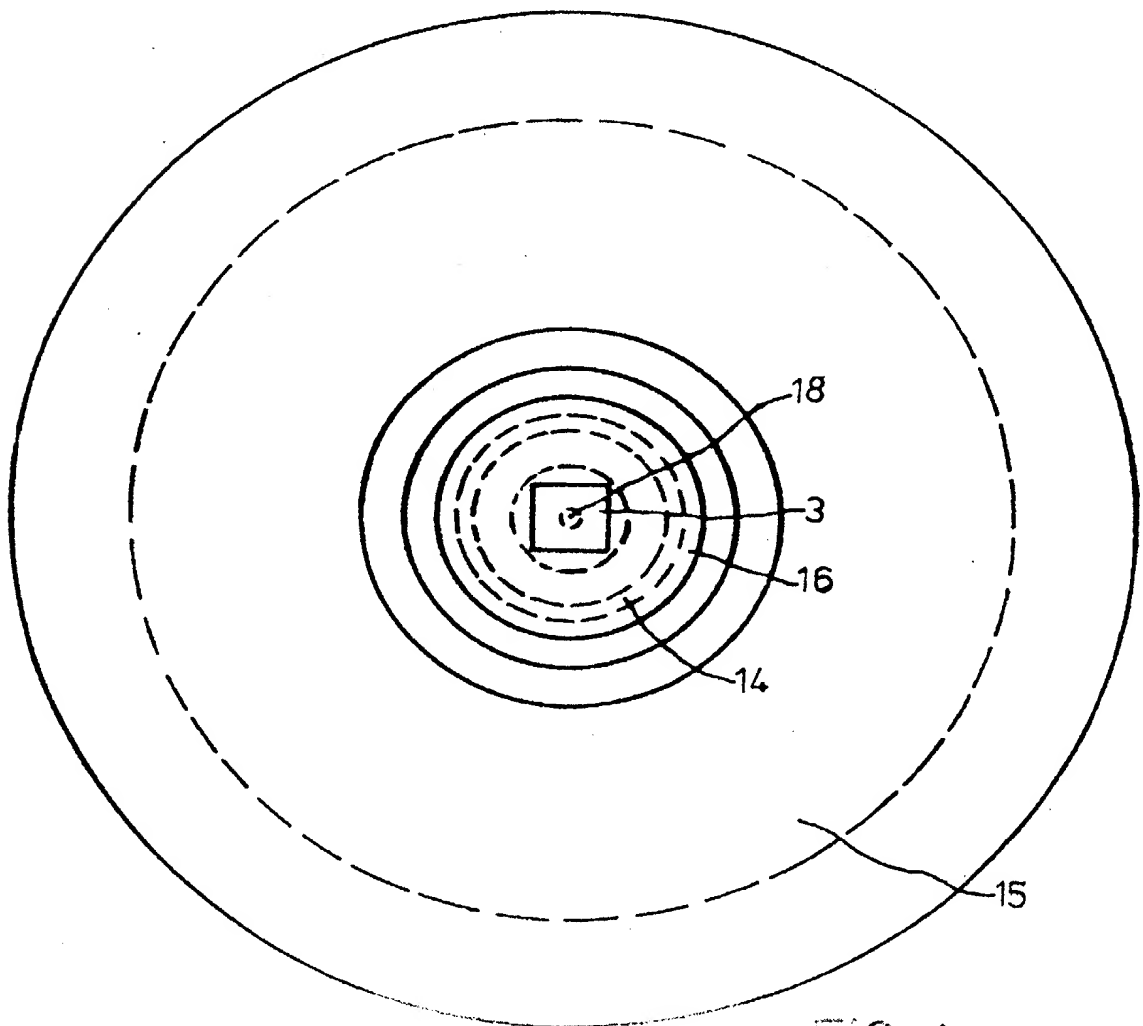


FIG. 4

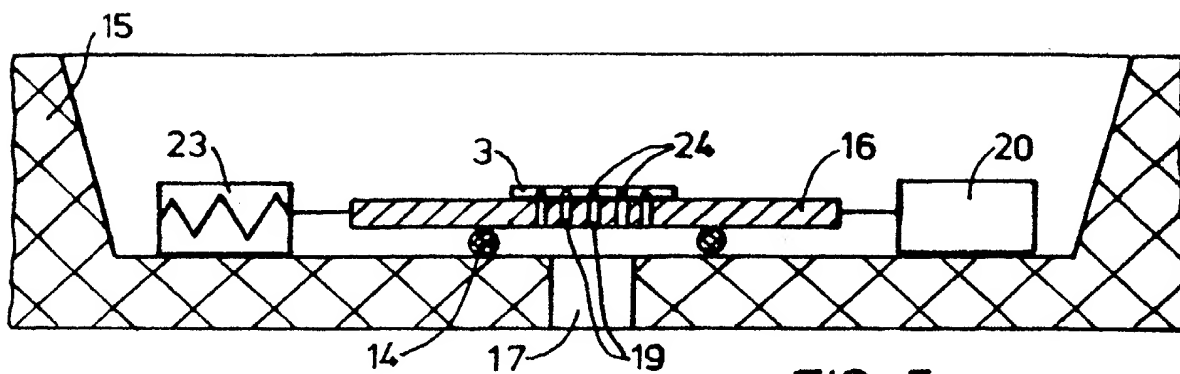


FIG. 5

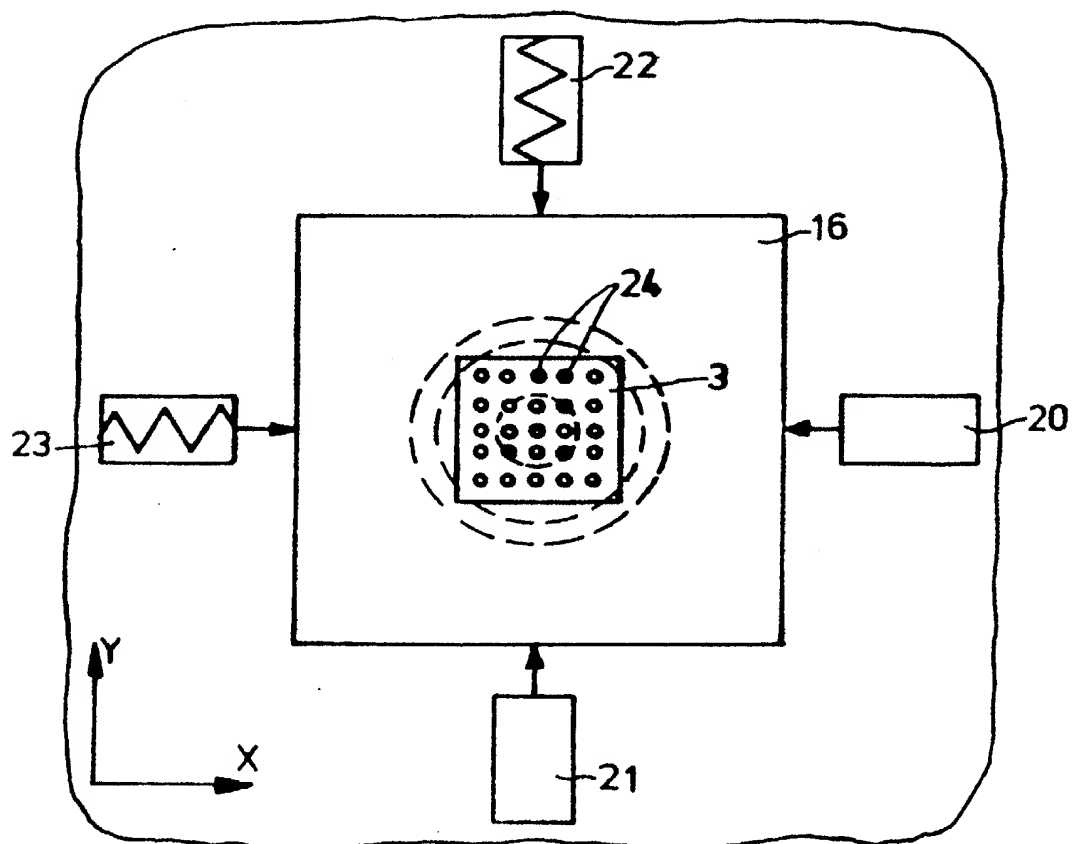


FIG. 6